



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ISMAEL NILO LINO DE QUEIROZ

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PERLIMINAR E EFEITOS NA
INFLAMAÇÃO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides***

FORTALEZA

2013

ISMAEL NILO LINO DE QUEIROZ

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PERLIMINAR E EFEITOS NA INFLAMAÇÃO DA
LECTINA DA ALGA MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Norma Maria Barros Benevides.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- Q44c Queiroz, Ismael Nilo Lino de.
Caracterização estrutural preliminar e efeitos na inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* / Ismael Nilo Lino de Queiroz. – 2013.
113 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
Coorientação: Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo.
1. Alga marinha. 2. Lectinas de plantas – Isolamento e purificação. 3. Lectinas de plantas – Química. 4. Neutrófilos. I. Título.

ISMAEL NILO LINO DE QUEIROZ

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PRELIMINAR E EFEITOS NA
INFLAMAÇÃO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERDE *CAULERPA*
CUPRESSOIDES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 19 / 02 / 2013.

BANCA EXAMINADORA

Norma Maria Barros Benevides

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ianna Wivianne F. de Araújo

Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo (Co-orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Vitor H. Pomin

Prof. Dr. Vítor Hugo Pomin (Externo)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A Deus.

Aos meus pais, Daniel e Maria José.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a primeiramente a Deus que me proporcionou a possibilidade de prosseguir nessa nova fase da minha vida, em que tive o prazer de continuar a trabalhar com a pesquisa, que a cada dia vejo que faz parte da minha vida profissional e por Ele sempre estar guiando-me em toda a caminhada que tenho feito desde que nasci.

Agradeço a Profa. Norma Maria Barros Benevides, por tudo que tem feito por mim, desde a graduação como seu aluno de iniciação científica e agora como seu aluno de mestrado, pelos conselhos e ajuda quando mais precisava, principalmente no tempo em que havia terminado a graduação, antes da seleção de mestrado, abrigando-me em seu laboratório como apoio técnico, preparando-me para a seleção de mestrado e por fim aceitando-me em seu laboratório quando passei na seleção. Posso dizer que é uma orientadora, uma mãe científica, e uma grande amiga, compreensível que faz tudo o que é possível pelos seus alunos e que posso considerar um exemplo de pessoa para a minha vida como profissional, uma pessoa de bem e que da mesma forma como vemos sua dedicação à pesquisa, anseio assim também ser quando iniciar minha carreira profissional como docente.

Agradeço a Ana Luíza Gomes Quinderé e a Natássia Albuquerque Ribeiro por todo o apoio e disponibilidade durante a realização dos experimentos, pois sem a ajuda das duas, acredito que não teria terminado esse trabalho, no entendimento dos experimentos e por participarem da “equipe de edema”.

Agradeço aos doutores Edfrank de Sousa Oliveira Vanderlei, Ianna Wivianne Fernandes de Araújo, José Ariévilto Gurgel Rodrigues e doutorandos Chistiane Oliveira Coura, Gabriela Almeida de Paula, Ricardo Basto Souza, Ticiane de Brito Lima e Ticiane Monteiro Abreu, pela ajuda na interpretação dos resultados dessa dissertação, conselhos e dicas que me foram úteis durante todo o período de trabalho. aos mestrandos Antônio Alves da Silva Neto, Renata Line da Conceição Rivanor e Valdécio Silvano Monteiro pela ajuda durante a extração e purificação da lectina, que se estivesse sozinho não teria conseguido material suficiente em tão pouco tempo.

Aos alunos de graduação Antônio Willame da Silva Alves, Felipe Barros Teles, Jane de Fátima Teixeira Silva, Livia Caroline Araujo Correia, Tayná da Silva Fiúza e Tereza Fabiula de Alencar Moura pela cooperação e amizade nos experimentos.

À Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra, da Faculdade de Medicina – Campus Sobral/UFC, pela atenção, carinho e hospitalidade durante o período que estive no Laboratório de Farmacologia.

À Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves, da Faculdade de Odontologia – Campus Sobral/UFC, pela sua amizade, gentileza, ensinamentos e atenção oferecida a mim durante a realização desta dissertação, disponibilizando a sua casa para me acomodar durante a realização dos meus experimentos no Campus Sobral/UFC.

À Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira, da Faculdade de Odontologia – Campus Sobral/UFC por contribuir para a realização das análises histopatológicas.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Campus Sobral/UFC, em especial a Kátia Alves (Kate) e Annyta Fernandes Frota pela ajuda imprescindível em muitos experimentos no laboratório.

Aos professores Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão e Dr. Vítor Hugo Pomin do Laboratório de Tecido Conjuntivo do Instituto de Bioquímica Médica – IBqM pela ajuda e hospitalidade durante a realização dos experimentos realizados na UFRJ.

A Ana Castelo de Melo Pereira pela sua amizade, hospitalidade e conselhos durante o período que estive realizando meus experimentos no Rio de Janeiro.

A minha família por todo apoio moral e força que precisei para prosseguir nesse trabalho, em especial minhas mães, Maria José Alves Lino, Maria Astrídia Alves Lino e Maria Osmarina Alves Lino, que nunca me deixaram sozinho e ao meu pai Daniel Rodrigues de Queiroz pela motivação e apoio.

Aos meus tios João Ferreira Cavalcante e Viena Alves Lino pela ajuda, hospitalidade e carinho em sua casa durante todo o período que estudei em Fortaleza.

Aos meus irmãos Edimundo da Silva Queiroz Neto, Daniel Rodrigues de Queiroz Filho e minha cunhada Mera Paula de Queiroz, pelo apoio e carinho durante toda a minha vida.

A minha namorada Heliude Mariano por todo amor, apoio e compreensão durante essa fase que passei e por sua paciência nas horas em que estava mais atribulado.

A Universidade Federal do Ceará, através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, cujos laboratórios foram utilizados para realizar meus experimentos.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica pela atenção e as ajudas de custos em congresso e na realização dos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes pelas constantes ajudas de custo e bolsa de pesquisa.

RESUMO

As lectinas de algas marinhas possuem várias aplicações farmacológicas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar parcialmente a estrutura e avaliar os efeitos em modelos clássicos de inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides*. A lectina de *Caulerpa cupressoides* (LCc) foi extraída com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A caracterização estrutural parcial apresentou uma sequência aminoterminal com 31 resíduos de aminoácidos, obtida de acordo com o método de degradação de Edman, enquanto que na espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional ^1H para a LCc purificada por Sephadex G-100 e obtida por DEAE-celulose, foi demonstrado uma similaridade entre os sinais obtidos em ambos os espectros. A atividade anti-inflamatória foi avaliada em ratos *Wistar* machos (n=6), utilizando o modelo de edema de pata induzidos por carragenana (700 $\mu\text{g/pata}$), dextrana (500 $\mu\text{g/pata}$), histamina (100 $\mu\text{g/pata}$), serotonina (20 $\mu\text{g/pata}$) ou bradicinina (30 $\mu\text{g/pata}$). Grupos de animais foram submetidos ao tratamento com LCc (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg; i.v.), 30 min antes do estímulo inflamatório. Foi avaliado o envolvimento da LCc (1,0 mg/kg) na via da Heme oxigenase-1. Foram utilizados grupos que receberam tratamento com LCc ligada ao inibidor mucina (8,0 mg/kg; i.v.) ou somente mucina (8,0 mg/kg; i.v.) e dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.) foram utilizados como controles. O efeito edematogênico de LCc foi avaliado aplicando as doses de 0,1; 1,0 ou 10 mg/kg (i.pl.). No ensaio de edema de pata induzido por carragenana, LCc reduziu a formação de edema sendo confirmado pela determinação dos níveis teciduais de mieloperoxidase. A LCc (1,0 mg/kg) ligada a mucina não apresentou efeito anti-inflamatório no edema de pata induzido por carragenana, exceto na primeira hora após o estímulo. No edema induzido por dextrana, LCc também inibiu o edema osmótico. Apenas a dose de 1,0 mg/kg foi utilizada no edema induzido por histamina reduzindo em 40% o edema no intervalo de 30 min LCc (1,0 mg/kg), entretanto, não reduziu a formação de edema induzido por serotonina ou bradicinina. Além disso, na análise histológica do tecido subplantar, LCc (1,0 e 10,0 mg/kg) foi capaz de reduzir a migração celular. Na presença de ZnPP IX (3,0 mg/kg; s.c.), LCc perdeu sua capacidade inibir o edema induzido por carragenana, exercendo seu mecanismo de ação anti-inflamatório através do envolvimento da via da HO-1. Enquanto que na imunohistoquímica, LCc (10 mg/kg) reduziu a expressão de IL-1 β , porém ocorreu intensa marcação das citocinas TNF- α e IL-6, além da expressão de HO-1, nos grupos tratados com a mesma dose de LCc. Com relação ao efeito edematogênico,

LCc foi capaz de induzir intenso processo inflamatório com efeito dose-dependente. No entanto, o edema induzido com a dose de 10 mg/kg de LCc foi inibido por indometacina, meclizina, pentoxifilina e dexametasona. Portanto, a LCc quando parcialmente caracterizada apresentou na sua sequência aminoterminal uma identidade de 43% com a proteína da alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* e apresentou propriedades anti- e pró-inflamatórias, sendo considerada um agente terapêutico em potencial para estudos futuros nos processos inflamatórios.

Palavras-chave: Aglutinina; Efeito edematogênico; Heme oxigenase-1; Mediadores inflamatórios; Neutrófilos.

ABSTRACT

Lectins seaweed have various pharmacological applications. This work was partially characterize the structure and evaluate the effects on classical models of inflammation lectin of the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. The *Caulerpa cupressoides* lectin (CcL) was extracted with Tris-HCl 25 mM, pH 7.5 and isolated by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. Structural characterization showed a partial aminoterminal sequence with 31 amino acid residues, obtained according to the method of Edman degradation, while in nuclear magnetic resonance spectroscopy to the CcL ¹H-NMR purified by Sephadex G-100 and DEAE-cellulose obtained by was demonstrated similarity between signals obtained in both spectra. The anti-inflammatory activity was evaluated in male Wistar rats (n = 6), using the model of paw edema induced by carrageenan (700 µg/paw), dextran (500 µg/paw), histamine (100 µg/paw), serotonin (20 µg/paw) or bradykinin (30 µg/paw). Groups of animals were treated with CcL (0.1, 1.0 or 10.0 mg/kg, i.v.) 30 min before the inflammatory stimulus. Was evaluated the involvement of CcL (1.0 mg/kg) towards heme oxygenase-1. Groups were used that were treated with inhibitor CcL linked mucin (8.0 mg/kg, i.v.) or only mucin (8.0 mg/kg, i.v.) and dexamethasone (1.0 mg/kg, s.c.) were used as controls. The effect edematogenic CcL was evaluated by applying the doses of 0.1, 1.0 or 10 mg/kg (i.pl.). In the trial of paw edema induced by carrageenan, CcL reduced edema formation was confirmed by determining tissue levels of myeloperoxidase. CcL (1.0 mg/kg) showed no mucin linked to anti-inflammatory effect on the paw edema induced by carrageenan, except in the first hour after stimulation. In dextran-induced edema, CcL also inhibited the osmotic swelling. Only the dose of 1.0 mg/kg was used in reducing histamine-induced edema by 40% the edema within 30 min CcL (1.0 mg/kg), however, did not reduce the edema induced by serotonin or bradykinin. Besides, in the histological analysis of tissue subplantar, CcL (1.0 and 10.0 mg/kg) was able to reduce cell migration. In the presence of ZnPP IX (3.0 mg/kg, s.c.), CcL has lost its ability to inhibit the carrageenan-induced edema, exerting its mechanism of action anti-inflammatory pathway through the involvement of HO-1. While in immunohistochemistry, CcL (10 mg/kg) reduced the expression of IL-1β, but intense staining occurred cytokines TNF-α and IL-6, and expression of HO-1 in the groups treated with the same dose of CcL. In relation the effect edematogenic, CcL was able to induce intense inflammatory process with dose-dependent effect. However, the induced edema at a dose of 10 mg/kg was CcL was inhibited by indomethacin, meclizine, pentoxifylline and

dexamethasone. Therefore, when the CcL partially characterized presented in its aminoterminal sequence of 43% identity with the protein from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and showed anti-and pro-inflammatory therapeutic agent is considered a potential for future studies in inflammatory processes.

Keywords: Agglutinin; Effect edematogenic; Heme oxygenase-1; Inflammatory mediators; Neutrophils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Migração dos Leucócitos da Corrente Sanguínea para o Tecido Lesado em Direção ao Agente Infeccioso.....	31
Figura 2 –	Cruzamento das Rotas de Atuação das Enzimas Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) na Inflamação.....	36
Figura 3 –	Biossíntese dos Produtos do Ácido Araquidônico.....	37
Figura 4 –	Aspecto Macroscópico da Alga Marinha <i>Caulerpa cupressoides</i> (A) e sua Classificação Taxonômica (B).....	47
Figura 5 –	Esquema de Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde <i>C. cupressoides</i> (Lcc).....	49
Figura 6 –	Cromatografia de Troca Iônica em Resina de DEAE-Celulose do Extrato Total da Alga <i>C. cupressoides</i>	60
Figura 7 –	Eletroforese (PAGE-SDS) do PI- DEAE da Alga Marinha Verde <i>C. cupressoides</i>	61
Figura 8 –	Alinhamentos Encontrados para a Sequência NH ₂ -terminal da LCc.....	62
Figura 9 –	Alinhamento do NH ₂ -terminal da LCc com NH ₂ -terminal da Proteína de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	62
Figura 10 –	Espectros 1D de Resonância Magnética Nuclear (¹ H-RMN em 600 MHz) da lectina da alga <i>C. cupressoides</i> obtida por procedimentos cromatográficos de DEAE-celulose (Perfil A) e Sephadex G-100 (Perfil B).....	64
Figura 11 –	Efeito da Administração de LCc da Alga <i>C. cupressoides</i> no Modelo de Edema de Pata Induzido por Carragenana (Cg).....	58
Figura 12 –	Estudo da Atividade da Mieloperoxidase (MPO) sobre o Influxo Celular no Tecido das Patas com Processo Inflamatório Induzido por Carragenana (Cg).....	68
Figura 13 –	Efeito da Lectina Associada ao Seu Ligante Mucina Sobre o Edema de Pata induzido por Cg.....	69
Figura 14 –	Análise do Envolvimento da Via da Heme oxigenase (HO-1) na	

	Atividade Anti-inflamatória da LCc.....	71
Figura 15 –	Efeito da administração de LCc da Alga <i>C. cupressoides</i> no Modelo de Edema de Pata Induzido por Dextrana.....	73
Figura 16 –	Efeito da Lectina Associada ao Seu Ligante Mucina Sobre o Edema de Pata Induzido por Dextrana.....	74
Figura 17 –	Efeito da Lectina Associada ao Seu Ligante Mucina Sobre o Edema de Pata Induzido por Histamina.....	77
Figura 18 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-1 β	79
Figura 19 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para HO-1.....	80
Figura 20 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para TNF- α	81
Figura 21 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-6.....	82
Figura 22 –	Efeito Edematogênico da Administração da LCc da Alga <i>C. cupressoides</i> no Modelo de Edema de pata em Ratos.....	83
Figura 23 –	Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da Lcc em Ratos.....	85
Figura 24 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-1 β	89
Figura 25 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para HO-1.....	90
Figura 26 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para TNF- α	91
Figura 27 –	Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da	

Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-6.....	92
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Edema de Pata Induzido por Histamina, Bradicininina ou Serotonina.....	76
Tabela 2 – Análise Histológica do Tecido da Pata de Ratos Induzidos por Cg Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE).....	78
Tabela 3 – Modulação Farmacológica Após a Injeção Local da LCc da Alga <i>C. cupressoides</i> no Modelo de Edema de Pata.....	86
Tabela 4 – Análise histológica do tecido da pata de ratos induzidos por LCc através da coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE	Ácido 5- hidroperoxieicosatetraenóico
AA	Ácido araquidônico
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina Séria Bovina
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
Cg	Carragenana
COX	Enzima cicloxigenase
DEAE	Dietilaminoetil
E.P.M.	Erro Padrão da Média
HO-1	Heme oxigenase-1
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitonal
i.pl.	Intraplantar
i.v.	Intravenosa
LCc	Lectina de <i>Caulerpa cupressoides</i>
L-NAME	L-N-nitro-arginina-metil-éster
LT	Leucotrieno
MPO	Mieloperoxidade
NH ₂ -terminal	Aminoterminal
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
PAF	Fator de Ativação Plaquetar
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pI	Ponto Isoelétrico
PIs	Prostaciclina
PLA2	Fosfolipase A2
s.c.	Subcutânea
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SIRS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator- α de Necrose Tumoral
TXs	Tromboxanos
UH	Unidades de Hemaglutinação
ZnPP IX	Zinco Protoporfirina IX

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Algas Marinhas.....	21
1.2	Importância Econômica das Algas Marinhas.....	22
1.3	Ordem Bryopsidales.....	22
1.4	Lectinas.....	23
1.5	Lectinas de Algas Marinhas.....	24
1.6	Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas.....	25
1.7	Características Físico-químicas de Lectinas de Algas Marinhas.....	27
1.8	Caracterização Estrutural de Lectinas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	28
1.9	Atividade Biológicas das Lectinas de Algas Marinhas.....	28
1.10	Inflamação.....	29
1.10.1	<i>Fase Vascular</i>	30
1.10.2	<i>Fase celular</i>	31
1.10.3	<i>Mediadores Inflamatórios</i>	33
1.10.4	<i>Via da Heme oxigenase-1 (HO-1)</i>	40
1.10.5	<i>Fármacos Utilizados na Dor e Inflamação</i>	41
2	OBJETIVOS.....	44
2.1	Geral.....	44
2.2	Específicos.....	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Materiais.....	46
3.1.1	<i>Drogas e Reagentes</i>	46
3.1.2	<i>Animais</i>	46
3.1.3	<i>Células Sanguíneas</i>	47
3.1.4	<i>Alga Marinha</i>	47
3.2	Métodos.....	48
3.2.1	<i>Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde <u>C. cupressoides</u></i>	48
3.2.1.1	<i>Preparação do Extrato Total</i>	48

3.2.1.2	<i>Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose.....</i>	49
3.2.1.3	<i>Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100.....</i>	49
3.2.2	<i>Determinação do Teor de Proteínas Totais.....</i>	50
3.2.3	<i>Determinação da Atividade Hemaglutinante.....</i>	51
3.2.4	<i>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante.....</i>	51
3.2.5	<i>Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida.....</i>	52
3.2.6	<i>Caracterização Estrutural Preliminar da LCc.....</i>	52
3.2.6.1	<i>Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Aminoterminal (NH₂-terminal) da LCc.....</i>	52
3.2.6.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional ¹H (¹H-RMN).....</i>	53
3.2.8	<i>Atividade Anti-inflamatória.....</i>	53
3.2.8.1	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana.....</i>	53
3.2.8.2	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrana.....</i>	54
3.2.8.3	<i>Edema de Pata Induzido por Histamina, Bradicnina e Serotonina.....</i>	54
3.2.8.4	<i>Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase.....</i>	55
3.2.8.5	<i>Análise do Envolvimento da Via da Heme oxigenase-1 (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LCc.....</i>	55
3.2.8.6	<i>Análise Histológica do Tecido Subplantar.....</i>	56
3.2.8.7	<i>Ensaio de Imunohistoquímica.....</i>	56
3.2.8.8	<i>Avaliação do Efeito Edematogênico da LCc.....</i>	58
3.2.8.8.1	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por LCc.....</i>	58
3.2.8.8.2	<i>Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LCc.....</i>	58
3.2.9	<i>Análises Estatísticas.....</i>	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde <i>Caulerpa cupressoides</i>.....	60
4.1.2	<i>Caracterização Estrutural Preliminar da Lcc.....</i>	61
4.1.2.1	<i>Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Aminoterminal (NH₂-terminal) da LCc.....</i>	61
4.1.2.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional ¹H.....</i>	64
4.2	Atividade Anti-inflamatória.....	66

4.2.1	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana.....</i>	66
4.2.2	<i>Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase.....</i>	68
4.2.3	<i>Análise do Envolvimento da Via da Heme oxigenase-1 (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LCc.....</i>	71
4.2.4	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrana.....</i>	73
4.2.5	<i>Edema de Pata Induzido por Histamina, Bradicinina e Serotonina.....</i>	75
4.2.6	<i>Análise Histológica.....</i>	78
4.2.7	<i>Imunohistoquímica da LCc.....</i>	79
4.2.8	<i>Avaliação do Efeito Edematogênico da LCc.....</i>	83
4.2.8.1	<i>Ensaio de Edema de Pata Induzido por LCc.....</i>	83
4.2.8.2	<i>Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LCc.....</i>	85
4.2.9	<i>Análise Histológica.....</i>	88
4.2.10	<i>Análise de Imunohistoquímica.....</i>	89
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
	CONCLUSÃO.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas Marinhas

O termo “algas” refere-se a uma variedade de organismos que são considerados como um grupo polifilético, que possuem representantes nos domínios Eubacteria e Eukarya. Além disso, sendo produtores primários, as algas tem semelhantes funções biológicas e ecológicas com as plantas, mas não compartilham uma história evolutiva comum e sua bioquímica difere significativamente em relação aos pigmentos acessórios, polissacarídeos de reserva, glicoproteínas e compostos fenólicos (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Durante muito tempo, as algas foram agrupadas em um grupo natural, que agora, especialmente, com o progresso em técnicas moleculares, tem mostrado que possui representantes em quatro dos cinco reinos (Monera, Protista, Fungi, Plantae). Durante sua evolução, as algas se tornaram um grupo muito diverso de organismos, cujas origens variadas refletiram-se na grande diversidade de tamanho, estrutura celular, níveis de organização e de morfologia, ciclo de vida, pigmentos fotossintetizantes, polissacarídeos de reserva e estruturais, ecologia e habitats (BRUNSWICK; JOHN, 2009).

As algas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e são responsáveis por uma boa parte da atividade fotossintética global. Sua distribuição depende da temperatura, da salinidade, da disponibilidade de luz solar, das correntes oceânicas e das condições físico-químicas dos oceanos (EL GAMAL, 2010).

Do ponto de vista botânico, elas são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta, que possui coloração verde, principalmente pela predominância das clorofilas a e b; Phaeophyta, com coloração marrom, principalmente pela presença dos pigmentos xantofila, fucoxantina e carotenóides; e Rhodophyta, que possui coloração vermelha devido à predominância dos pigmentos ficoeritrina e ficocianina. Devido as constantes mudanças no ambiente marinho, grupos de algas mais adaptados foram selecionados, por meio de uma variedade de estratégias de sobrevivência, as quais influenciaram enormemente a sua morfologia, fisiologia e bioquímica (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas marinhas são organismos autotróficos de grande importância ecológica, que sintetizam inúmeras classes de compostos bioativos, normalmente envolvidos nos processos metabólicos (primário e secundário), que são importantes para a defesa química desses organismos contra herbívoros (SZE, 1997) e que podem ser utilizadas em diversos ramos da biotecnologia (GREENWELL *et al.*, 2008; LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969).

1.2 Importância Econômica das Algas Marinhas

Muitas espécies de algas marinhas são utilizadas na alimentação há milênios pelos povos orientais em sua dieta e na medicina tradicional (JIAO *et al.*, 2011; LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969). Mais recentemente, as algas têm sido utilizadas como complemento de rações para animais e fertilizantes (ZEMKE-WHITE; OHNO, 1999).

A exploração econômica das algas marinhas iniciou-se a partir de coletas realizadas em bancos naturais para utilização na alimentação e na extração de ficocolóides (carragenanas, agaranas e alginatos). Desde então, existe um crescente interesse no cultivo de espécies, no intuito de minimizar a dependência de bancos naturais (OLIVEIRA; ALVEAL; ANDERSON, 2000).

1.3 Ordem Bryopsidales

Os exemplares da ordem Bryopsidales, também citadas como Caulerpales, Siphonales ou Codiales, são essencialmente marinhos e de águas tropicais apresentando organização filamentosa cenocítica, assumindo um formato de uma célula gigante devido à presença de numerosos filamentos de material de parede celular denominados de trabécula, e constituídos geralmente, de um talo rastejante de formato macroscópico, fixado ao substrato através de uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizóides, estes se apresentando na forma simples ou em tufos (JOLY, 1965; SZE, 1997). Ao longo de toda a sua porção rizomatosa são encontrados ramos eretos

(também chamados de assimiladores) que, por sua vez, são ramificados dependendo da morfologia de cada espécie e cenocíticos em todas as porções (SZE, 1997).

Dependendo da espécie, a porção rizomatosa pode ser encontrada com formato de pena, folhas ou cacho de uvas (RODRIGUES *et al.*, 2012a, 2012b; TRI, 2009).

Caulerpa é um gênero de algas verdes, da família Caulerpaceae, morfologicamente incomum por ser caracterizado como uma única célula contendo vários núcleos. A parede celular dos representantes deste gênero é destituída de celulose e apresenta polímeros de xilano e manana ligados através de ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$, respectivamente (LEE, 1997). As espécies *C. cupressoides*, *C. mexicana*, *C. prolífera*, *C. racemosa* e *C. sertularioides* são as mais comuns no litoral brasileiro (JOLY, 1965), formando extensos tapetes verdes na zona entre marés (SZE, 1997).

Alem disso, podem oferecer inúmeros compostos químicos que tem revelado importantes resultados nas mais variadas aplicações biológicas e industriais (CARDOZO *et al.*, 2007). Dentre estes compostos, destacam-se as lectinas.

1.4 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, com ampla distribuição na natureza, já foram encontradas em bactérias, fungos, algas, vegetais superiores, vertebrados, invertebrados e vírus, que se caracterizam por ligar-se de forma reversível a carboidratos específicos. Os animais produzem uma variedade de lectinas, muitas delas classificadas em famílias, dependendo da similaridade da sequência e da especificidade ao carboidrato (LIS; SHARON, 1998).

O termo “Lectinologia”, primeiramente referido por Potapov (1968) e ainda hoje bastante aceito, vem a enfatizar a existência das lectinas como precursoras de uma nova e promissora ferramenta biotecnológica de vasto potencial e aplicabilidade.

Consideradas como sendo uma classe especial de proteínas bioativas que possuem uma atividade ligante a carboidratos, as lectinas, também conhecidas como aglutininas ou hemaglutininas (VAN DAMME *et al.*, 1998), são atualmente tidas como possíveis

ferramentas de elucidação da informação biológica contida nos açúcares, tendo em vista seu importante papel no reconhecimento celular (NEVES, 1999).

As lectinas formam um grupo heterogêneo de proteínas que apresentam grande variedade em tamanho, estrutura e organização molecular, que possuem, em comum, a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados. Devido a essa capacidade de interação a carboidratos, as lectinas podem se ligar a certos componentes da membrana das células sanguíneas, ocasionando aglutinação, que constitui no principal atributo para sua detecção, purificação e caracterização (LIS, SHARON, 1998).

As lectinas, quanto a sua estrutura, estão divididas em 4 tipos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; 1998):

a) Merolectinas: São lectinas que possuem um único domínio ligante a carboidrato, portanto não aglutinam hemácias;

b) Hololectinas: Possuem dois ou mais domínios ligantes a carboidrato; a maior parte das lectinas pertence a esse grupo, pois se comportam como hemaglutininas;

c) Quimerolectinas: Caracterizam-se por uma fusão de proteínas que possuem pelo menos um domínio ligante a carboidrato e outro domínio com atividade catalítica;

d) Superlectinas: São lectinas que possuem 2 ou mais domínios ligantes a carboidratos, sendo que esses domínios têm especificidade para açúcares diferentes.

1.5 Lectinas de Algas Marinhas

O primeiro relato de lectinas em algas marinhas foi descrito por Boyd; Almodovar; Boyd, em 1966, que através de “screening” de detecção de lectinas em algas marinhas, demonstraram que essas moléculas são capazes de aglutinar eritrócitos de seres humanos. Desde então, as lectinas vêm sendo frequentemente encontradas em algas marinhas, sendo as algas vermelhas (Rhodophyceae) as mais estudadas, seguidas pelas algas verdes (Chlorophyceae) e pardas (Phaeophyceae) (ABREU *et al.*, 2012).

No Brasil, 27 espécies de algas marinhas coletadas na costa da região Nordeste foram testadas em ensaios de detecção de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de animais e humanos tratados com tripsina, bromelaína, papaína ou subtilisina. Os resultados

apontaram dados positivos de hemaglutinação em 12 espécies, entre as algas marinhas verdes, vermelhas e pardas, sendo cada uma delas capaz de aglutinar pelo menos um dos tipos de eritrócitos enzimaticamente tratados e testados (AINOUZ *et al.*, 1992). Dentre os eritrócitos testados, aqueles obtidos de coelho foram mais sensíveis à hemaglutinação, acompanhados dos demais eritrócitos tratados com papaína. Duas espécies de algas vermelhas (*Acanthophora spicifera* e *Enantiocladia duperreyi*) e uma de alga verde (*Ulva fasciata*) exibiram atividade hemaglutinante frente a eritrócitos do grupo O de humanos, enquanto que algas verdes das espécies *Codium isthmocladium* e *Caulerpa sertularioides* foram específicas para eritrócitos humanos do grupo B. Três espécies de algas dentre as demais testadas, entre elas a alga vermelha *Amansia multifida* e as algas pardas *Spatoglossum schroederi* e *Padina gymnospora* apresentaram uma especificidade não usual para eritrócitos dos grupos A e O de humanos (AINOUZ *et al.*, 1992).

Quando foram colocadas em contato com eritrócitos de coelho, galinha, carneiro e humanos tratados enzimaticamente. A maioria dos extratos aglutinou pelo menos um dos eritrócitos testados. Eritrócitos de carneiro e de coelho foram os mais satisfatórios para a detecção da presença de lectinas (FREITAS *et al.*, 1997).

1.6 Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas

A primeira lectina purificada e caracterizada parcialmente foi da espécie de alga marinha vermelha *Ptilota plumosa*, por Rogers, Blunden e Evans, em 1977. Os procedimentos de isolamento de lectinas de algas marinhas geralmente são iniciados a partir da extração de proteínas solúveis do material biológico, com o uso de soluções salinas tamponantes. Após a obtenção desses extratos protéicos, tais proteínas solúveis passam por uma série de etapas que podem se estender desde precipitações salinas das mesmas, até emprego de variadas matrizes cromatográficas, sejam elas de filtração em gel, troca iônica ou afinidade.

As cromatografias de troca iônica têm se mostrado de grande utilidade no processo de purificação de lectinas de algas, sendo utilizadas de forma isolada ou em combinação com outros procedimentos cromatográficos. Por exemplo, a lectina da alga marinha vermelha *P. serrata* foi purificada pela combinação de processos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel e exclusão molecular em Bio Gel P-100 (ROGERS,

HORI, 1993). Ainouz *et al.* (1995) purificaram as lectinas de duas espécies de algas marinhas vermelhas, *Briothamnion seaforthii* e *B. triquetrum*, através de um procedimento de precipitação protéica em meio ácido, seguido por precipitação com sulfato de amônio (60% de saturação). A fração proteica (fração 0/60) obtida foi submetida ao procedimento de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose.

Atualmente, há uma grande tendência no uso de cromatografias de afinidade para a purificação de lectinas de algas marinhas, tendo em vista a maior praticidade, principalmente no tocante a redução do número de etapas de purificação e ao fato destas apresentarem uma maior confiança na pureza do material obtido. Sampaio, Rogers e Barwell (1998) utilizaram a galactose presente na goma de guar no processo de isolamento da lectina da alga marinha vermelha *P. filicina*. Oliveira *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2010a) isolaram a lectina presente na alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* utilizando procedimento cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar. Enquanto que, Costa *et al.* (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento da lectina presente na alga marinha vermelha *A. multifida*.

Com relação à purificação de lectinas de algas marinhas verdes, a alga *Caulerpa cupressoides* foi purificada por cromatografia de afinidade em gel de α -lactose-agarose, seguida de filtração em gel em Bio Gel P-100 (BENEVIDES *et al.*, 2001). Vanderlei *et al.*, (2010) purificou a mesma lectina utilizando o procedimento de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, seguido de filtração em gel de Sephadex G-100, onde foi demonstrado um rendimento semelhante ao obtido por Benevides *et al.* (2001).

Em resumo, várias lectinas de algas marinhas têm sido purificadas e caracterizadas. No entanto, seu número é considerado ainda bastante reduzido quando comparado a lectinas isoladas e caracterizadas de plantas superiores, o que favorece a possibilidade de novos estudos sobre lectinas de algas marinhas, utilizando procedimentos diversos de purificações.

1.7 Características Físico-químicas de Lectinas de Algas Marinhas

Lectinas de algas marinhas diferem das de vegetais superiores em várias propriedades. Em geral, têm pequena massa molecular e não reconhecem açúcares simples, sendo mais específicas para oligossacarídeos complexos, em especial, glicoproteínas. Além disso, muitas das lectinas de algas marinhas não requerem cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas (ROGERS, HORI, 1993). Estas proteínas ocorrem principalmente na forma monomérica e têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos, com ponto isoelétrico entre 4 e 6 (HORI, MIKAZAWA, ITO, 1990).

As lectinas das algas verdes *C. adherens*, *C. effusum*, *C. capitatum* e *C. platylobium*, foram purificadas por Rogers *et al.* (1994) e os dados obtidos por eletroforese em SDS- PAGE revelaram que todas as quatro lectinas apresentavam massas aparentes entre 11 e 13 kDa e não dependiam de cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas.

As lectinas das algas marinhas vermelhas *B.seaforthii* e *B.triquetrum*, isoladas por Ainouz *et al.* (1995), mostraram-se não dependentes de cátions divalentes e não foram inibidas por açúcares simples. Essas lectinas apresentaram uma simples banda com mobilidade semelhante por SDS-PAGE e massas moleculares estimadas por filtração em gel de 4,5 kDa e 3,5 kDa para *B. seaforthii* e *B.triquetrum*, respectivamente. Um estudo comparativo dessas duas lectinas e suas estruturas foi feito por Nagano *et al.* 2005 em que ambas consistem de misturas de polipeptídios de 90 resíduos contendo sete pontes dissulfeto intracadeia e que suas sequências possuem 55% de identidade (80% similaridade) entre si.

Benevides, Leite e Freitas (1996) isolaram uma lectina monomérica da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*, com 1,5% de sua composição constituída de açúcar. Essa lectina foi inibida pelo polissacarídeo manana de levedura, e as glicoproteínas avidina “egg white” e ovalbumina e quando analisada por cromatografia de filtração em gel de Superose 12-R (FPLC) revelou uma massa de 21,9 kDa, enquanto por SDS- PAGE, apresentou uma massa molecular estimada em 29 kDa.

Costa *et al.* (1999) estudando a alga marinha vermelha *A. multifida*, observaram que a lectina presente nessa alga marinha era constituída de 2,9% de açúcares neutros e era inibida pelas glicoproteínas avidina, fetuína, “egg white” e levedura de manana. A massa molecular dessa proteína foi estimada em 26,9 kDa por filtração em gel e em 24,5 por SDS-

PAGE. A focalização isoelétrica detectou a presença de cinco isolectinas com ponto isoelétrico (pI) ácido variando entre 5,4 e 6,2. A análise de aminoácidos mostrou que essa lectina é rica em prolina, glicina e ácido aspártico e pobre em histidina e fenilalanina.

A lectina purificada da *C. cupressoides* foi inibida por outros derivados da galactose, por dissacarídeos (α -lactose) e fortemente inibida por mucina de estômago de porco. Sua massa molecular, determinada por filtração em gel, foi de 44,7 kDa, e quando analisada por SDS- PAGE na presença de β -mercaptoetanol, apresentou uma massa molecular aparente de aproximadamente 23,2 kDa, com predominância de glicina, de aminoácidos ácidos glutâmico e aspártico e do aminoácido hidroxilado serina em sua composição (BENEVIDES *et al.*, 2001).

1.8 Caracterização Estrutural de Lectinas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia por RMN tem sido utilizada para determinar a conformação de diversos carboidratos nos sítios de ligação de proteínas. A lectina de germe de trigo foi uma das primeiras a ser estudada sua interação com carboidratos mediante RMN (CHÁVEZ *et al.*, 2005; WRIGHT, 1984). Zanetta *et al.*, 2002 utilizando ^1H -RMN para identificar o sítio de ligação da lectina interleucina 3 (IL-3) e sua interação com o proteoglicano sulfato de condroitina.

1.9 Atividades Biológicas das Lectinas de Algas Marinhas

Atualmente as lectinas têm sido alvo de pesquisas constantes. Isso se deve a sua impressionante capacidade de ligar-se especificamente a carboidratos ou substâncias que os contêm, propiciando um imenso campo de aplicação biológica em diversas áreas, como na agricultura, na bioquímica, nas ciências biomédicas e na farmacologia (BENEVIDES *et al.*, 2001). Neste contexto, um atrativo para a utilização de lectinas de algas marinhas é o fato das mesmas possuírem massa molecular menor do que as lectinas de plantas, sendo então,

apropriadas para o uso como ferramentas biológicas, pois o menor tamanho dessas moléculas implicaria em uma menor reação antigênica (ROGERS; HORI, 1993).

Estudos realizados com as lectinas das algas marinhas vermelhas *Solieria robusta*, *Eucheuma serra*, *E. amakusaensis* e *E. cottonii* demonstraram que as mesmas apresentam forte atividade mitogênica (HARNEDY; FITZGERALD, 2011).

A lectina da alga marinha vermelha *Gracilaria ornata* inibiu a emergência das larvas do gorgulho *Callosobruchus maculatus*, mostrando-se como uma potente ação inseticida (LEITE *et al.*, 2005). Além desse estudo foi também observado que as lectinas das algas vermelhas *S. filiformis* e *G. cornea* apresentaram um efeito inseticida contra o carrapato *Boophilus microplus* (carrapato bovino) (LIMA *et al.*, 2005; NASCIMENTO, 2003).

No estudo realizado com a lectina da alga *S. filiformis* foi demonstrado que essa proteína possui efeito sobre o crescimento de eubactérias patogênicas, inibindo somente o crescimento de algumas espécies de bactérias Gram-negativas (HOLANDA *et al.*, 2005).

Efeitos antinociceptivos significativos têm sido demonstrados por lectinas de algumas espécies de algas marinhas. Dentre estas estão as algas vermelhas *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum*, *A. multifida*, *Hypnea cervicornis* e *S. filiformis* e a alga verde *C. cupressoides* (ABREU *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2007; VANDERLEI *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2002).

Com relação aos processos inflamatórios, algumas lectinas de algas tiveram efeitos pró-inflamatórios, induzindo a migração de neutrófilos em ratos e camundongos (NEVES *et al.*, 2001). Enquanto que outras lectinas das algas marinhas tais como *H. cervicornis* e *P. capillacea* apresentaram efeito anti-inflamatório (BITENCOURT *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010a).

1.10 Inflamação

Inflamação é uma reação defensiva do corpo à penetração de um agente infeccioso, entrada de um antígeno ou ao dano celular. É um processo biológico fundamental e a sinalização frequente de uma doença. A inflamação é frequentemente induzida por

produtos da degradação bacteriana (lipopeptídeos, lipopolisacarídeos, peptídeoglicanos, flagelos, DNA bacteriano), fungos (zymosan), vírus (dupla fita de RNA) ou microorganismo que causam danos e a morte das células do hospedeiro (KULINSKY, 2007).

1.10.1 Fase vascular

A inflamação caracteriza-se como uma resposta dos tecidos vascularizados a estímulos nocivos, tais como injúria, patógenos ou agentes irritantes (TEIXEIRA *et al.*, 2003; WEISS, 2008).

Os processos inflamatórios são necessários para a vigilância imunológica, reparação e regeneração após a lesão (VODOVOTZ *et al.*, 2008). No entanto, a inflamação excessiva ou inadequada é a causa de inúmeras doenças, incluindo artrite reumatóide, psoríase e doenças inflamatórias intestinais. Além disso, a inflamação é o maior componente dos danos causados por doenças auto-imunes e é um colaborador fundamental para doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (LUCAS *et al.*, 2006).

O processo inflamatório é controlado por um grupo de substâncias chamadas mediadores químicos (TEIXEIRA *et al.*, 2003) que podem ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos, ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas (GILMAN *et al.*, 2006; SPINOSA *et al.*, 2006). Muitas dessas moléculas são produzidas localmente e possuem participação comprovada na inflamação dos tecidos, e são, portanto, alvos fundamentais para a intervenção terapêutica em uma variedade de doenças (LUCAS *et al.*, 2006; MEDZHITOV, 2008).

No local da inflamação, esses mediadores promovem a vasodilatação, a estase vascular e o aumento da permeabilidade capilar, permitindo também a migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e ainda coordenam as variadas respostas de defesa local. Alguns desses mediadores têm a capacidade de estimular neurônios sensoriais locais. Em alguns casos, quando a inflamação excede certos níveis, quantidades suficientes desses mediadores endógenos entram na circulação sistêmica e são disseminados pelo sangue a diferentes órgãos. Isso resulta numa complexa variedade de reações sistêmicas, coletivamente

chamadas de resposta de fase aguda, que é definida como uma resposta multifatorial do organismo a infecções, lesões ou traumas (ROTH *et al.*, 2009).

A inflamação aguda caracteriza-se pela curta duração e apresenta os sinais cardeais que são a dor, o calor, o rubor, o edema e a perda da função (LEES *et al.*, 2004). Já na fase crônica, além de perdurar por um período indeterminado, varia de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos (GILMAN *et al.*, 2006; SPINOSA *et al.*, 2006).

Portanto, a resposta inflamatória é um fenômeno complexo que envolve eventos vasculares e celulares (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993; MALIK; LO, 1996; MCEVER, 1992). A princípio, desenvolve-se a fase vascular da inflamação, que se caracteriza por vasodilatação, que confere o aspecto avermelhado ao tecido e o calor à região, bem como o aumento da permeabilidade vascular. Tais eventos facilitam a passagem de proteínas plasmáticas para o tecido, carreando, conseqüentemente, uma grande quantidade de água, dando origem ao edema (MEDZHITOV, 2008).

1.10.2 Fase Celular

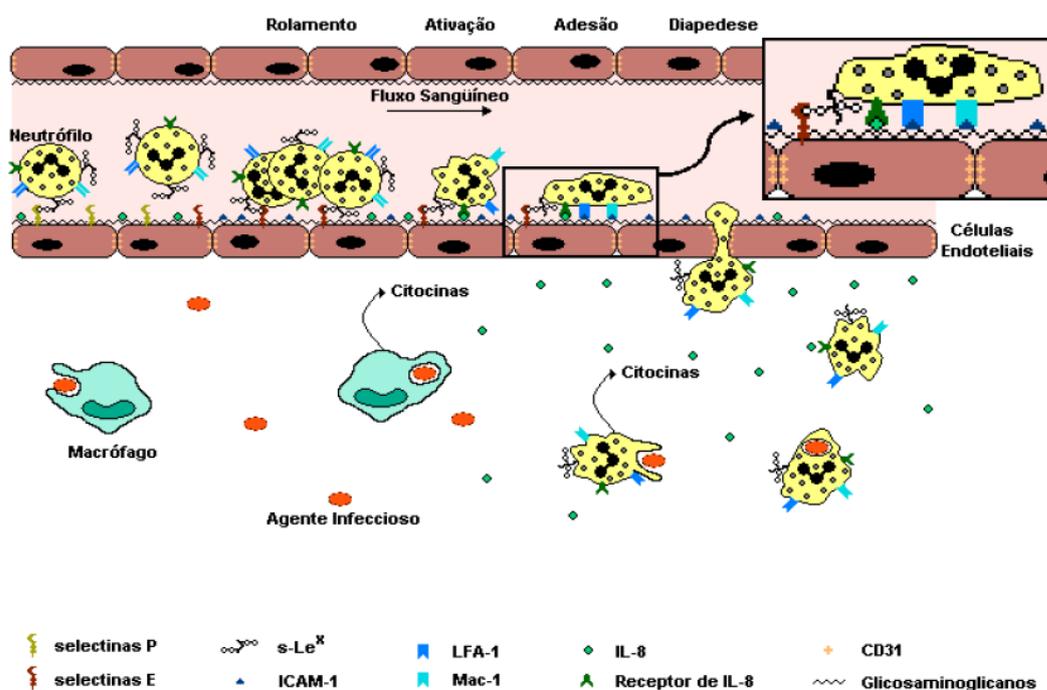
A fase vascular ocorre simultaneamente à fase celular (LEES *et al.*, 2004). Nesta fase, os leucócitos circulantes aderem-se ao endotélio vascular e transmigram para o tecido intersticial em direção ao local da lesão através da diapedese, sob sinalização de agentes quimiotáticos. O recrutamento de leucócitos é iniciado pelo rolamento dos neutrófilos mediado por selectinas no endotélio vascular, os quais se aderem de maneira fraca às células endoteliais. Em seguida ocorre rápida ativação de integrinas com subsequente adesão firme aos ligantes endoteliais, transporte transendotelial e a partir de então realizam a diapedese (Figura 1) (LEY *et al.*, 2007; PHILLIPSON *et al.*, 2006; TARRANT; PATEL, 2006).

O tipo celular predominante nesta fase pode ser de células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), quando diante de um processo inflamatório agudo, ou de células mononucleares (monócitos e linfócitos), em um processo inflamatório crônico. Outras células tais como as células endoteliais, macrófagos, mastócitos e plaquetas podem estar

envolvidas (LEES *et al.*, 2004). Segundo Ribeiro *et al.* (2000), mastócitos e macrófagos são responsáveis pela liberação de citocinas e prostaglandinas, respectivamente.

Estas células, principalmente neutrófilos, são responsáveis pela expressão da enzima heme oxigenase-1, responsável pela resposta a processos inflamatórios, durante o rolamento e adesão à superfície endotelial (FREITAS *et al.*, 2006).

Figura 1 – Migração dos Leucócitos da Corrente Sanguínea para o Tecido Lesado em Direção ao Agente Infeccioso.



Fonte: BEZERRA, 2005.

Interações fracas mediadas por selectinas possibilitam o rolamento dos neutrófilos sobre a superfície do endotélio. Em seguida ocorre ativação das integrinas com subsequente adesão forte dos leucócitos às células endoteliais e por fim a diapedese.

No caso de uma evolução favorável, o processo inflamatório resulta na eliminação do agente causal, seguida por uma fase de reparação e resolução, que é mediada principalmente por macrófagos residentes nos tecidos e nas células recrutadas (SERHAN; SAVILL, 2005). No entanto, se a evolução for desfavorável, pode ocorrer supuração, ou seja, os micro-organismos superam as defesas orgânicas, lisando as células leucocitárias, formando

coleção purulenta ou pode haver a cronificação do processo (GILMAN *et al.*, 2006; KATZUNG, 2006; SPINOSA *et al.*, 2006).

Estas respostas de defesa são iniciadas e reguladas por uma variedade de diferentes mediadores liberados por diferentes tipos de células, e a compreensão dos efeitos, dos mecanismos de ação e dos usos clínicos dos fármacos que afetam as respostas inflamatórias e imunológicas depende de uma avaliação do modo pelo qual estas células e seus mediadores interagem (RANG *et al.*, 2007).

1.10.3 Mediadores Inflamatórios

Os mediadores do processo inflamatório originam-se tanto do plasma como de células ou do tecido agredido. Os mediadores oriundos do plasma, como o sistema complemento, estão presentes em formas precursoras que, para adquirir suas propriedades biológicas, precisam ser ativados através de uma série de clivagens proteolíticas. Já aqueles oriundos das células estão contidos em grânulos intracelulares, os quais precisam ser secretados, como a histamina presente nos mastócitos, ou são sintetizados em resposta a um determinado estímulo adverso, como as prostaglandinas. As principais fontes celulares são plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos (KUMAR; COTRAN; ROBBINS, 2003; MAJNO; JORIS, 2004).

Desta forma, os mediadores químicos, cada um com seu papel específico, podem desencadear, conduzir, controlar e extinguir a inflamação, atuando em estágios definidos da reação inflamatória. Dentre os principais grupos de mediadores, incluem-se: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cinina-bradicinina, sistema complemento, sistema coagulação-fibrinolítico); metabólitos do ácido araquidônico (via ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase); proteases lisossômicas; radicais livres derivados de oxigênio; fatores ativadores de plaquetas; quimiocinas e citocinas (ALBERTINI *et al.*, 2004; KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005)

A histamina exerce uma série de efeitos em muitos processos patológicos e fisiopatológicos. Durante a inflamação, a mesma é liberada através da degranulação dos mastócitos e basófilos. Os principais papéis da histamina são aqueles envolvidos na

inflamação, secreção gástrica e como neurotransmissora. A histamina atua nas células endoteliais, causando a vasodilatação e um aumento na permeabilidade vascular. Na pele, resulta em vermelhidão e aparecimento de uma pápula. No sistema gastrointestinal é essencial para secreção do ácido gástrico, podendo agir sobre as células parietais para estimular H^+ , K^+ ATPase, levando à secreção de H^+ e subsequente acidificação que auxilia no processo digestivo (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008). Além disso, modula uma variedade de funções fisiológicas do Sistema Nervoso Central (SNC) dos mamíferos, tais como sono/vigília, atenção, ansiedade, dor, percepção, homeostase, equilíbrio de fluidos, apetite, temperatura corporal, aprendizagem e memória (OGAWA *et al.*, 2009).

Fator de ativação plaquetária (PAF) é um potente e versátil mediador da inflamação que é produzido por vários tipos de células e tecidos, e particularmente por leucócitos. PAF atua em um único receptor (PAFR) que pode ser expresso na membrana plasmática ou na porção externa do núcleo de vários tipos de células, mas especialmente de leucócitos, plaquetas e células endoteliais. A liberação endógena de PAF pode ser responsável por várias das manifestações de inflamação aguda. A administração do PAF em roedores ou humanos reproduz muitas características da síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), incluindo hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, hemoconcentração, liberação de citocinas e choque (ISHII; SHIMIZU, 2000; STAFFORINI *et al.*, 2003).

Outros peptídeos vasoativos são gerados através da proteólise pelo fator de Hageman, da trombina ou plasmina e causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (seja diretamente ou induzindo a liberação de histamina por mastócitos). O fator Hageman tem um papel fundamental na coordenação destas respostas, e atua em ambas como um sensor de dano vascular e indutor da inflamação. O fator Hageman ativa a cascata da calicreína cininas, e o principal produto desta cascata, a bradicinina, afeta o sistema vascular, bem como apresenta um potente efeito pró-álgico (estimulando a dor) (GRAHAM *et al.*, 1964).

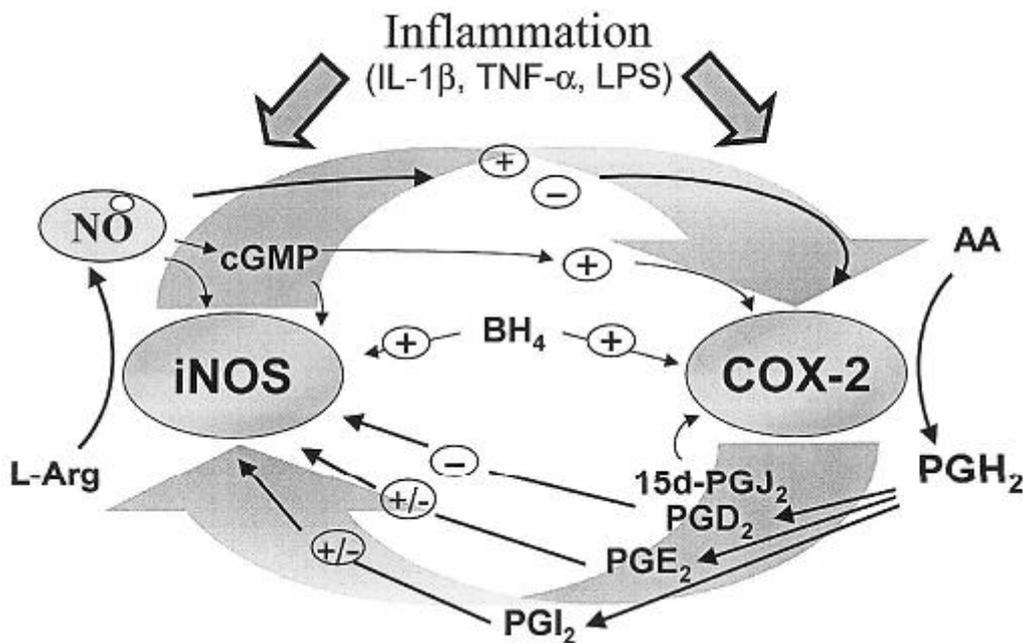
Bradicinina (BK, H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH) é conhecida por apresentar um potente efeito pró-inflamatório e é um dos mais potentes peptídeos alogênicos endógenos. BK é formada no plasma e em tecidos inflamados e, pela ativação de receptores B_2 presentes na membrana de vários tipos de células, inicia muitos processos, tais como vasodilatação, extravasamento de plasma, ativação de células imunológicas, além de

induzirem a quimiotaxia dos leucócitos e a ativação dos neurônios nociceptivos (MEINI; MAGGI, 2008).

A serotonina é uma indolamida, produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido L-triptofano (LAZAROU; POMERANZ; COREY, 1998). É um neurotransmissor responsável pelo humor e pela ansiedade, e, quando é liberada na fenda sináptica, se liga a seus receptores localizados tanto na fibra pré-sináptica quanto na fibra pós-sináptica. Estudos revelam que não existe um receptor específico para a serotonina, mas uma superfamília de 14 receptores, denominados 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT5B, 5-HT6 e 5-HT7, com funções e localizações específicas nas áreas pré e pós-sinápticas (OLIVIER; VAN OORSCHOT, 2005; SILVA; de ANDRADE, 2008).

O óxido nítrico induzível (NOi) é uma molécula gasosa multifuncional além de ser um radical livre altamente reativo. Ele é sintetizado a partir de L-arginina, NADPH e oxigênio pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), esta enzima é expressada juntamente com a ciclo-oxigenase 2 e suas rotas de interação no processo inflamatório estão intimamente relacionados (Figura 2). Como uma molécula sinalizadora, NO regula vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, tais como funções vasculares (angiogênese, fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, interação leucócito-endotélio, agregação plaquetária e fluxo microlinfático), funções neurológicas (neurotransmissão e desenvolvimento do sistema nervoso) e funções citotóxicas. Vários estudos têm mostrado que o NO pode tanto promover e inibir a progressão do tumor e sua metástase além de mediar sua permeabilidade vascular (DOI *et al.*, 1999). Os efeitos de NO em tumores parecem depender da atividade e da localização das isoformas de NOS, concentração e a duração da exposição ao NO e sensibilidade celular para NO (FUKUMURA; KASHIWAGI; JAIN, 2006).

Figura – 2 Cruzamento das Rotas de Atuação das Enzimas Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) na Inflamação.



Fonte: PÉREZ-SALA; LAMAS, 2001

Uma intrincada relação existe entre as rotas da COX-2 e NOS. Na inflamação as isoformas induzíveis destas enzimas são expressadas em resposta de um estímulo similar. Em adição, os produtos das duas rotas, NO e PGs, podem regular a atividade e/ou expressão de iNOS e COX-2.

As COXs são enzimas bifuncionais que sequencialmente geram PGG₂ e PGH₂ através de uma reação em duas etapas envolvendo a cicloxigenação e peroxidação do substrato ácido graxo, que é principalmente o ácido araquidônico. PGH₂ é, por sua vez, transformada por várias sintases nas PGs e TXs. Enquanto TXA₂ é o principal produto da via da COX em plaquetas, PGE₂ é sintetizada em muitos tipos diferentes de células. PGI₂, também chamada prostaciclina, é sintetizada principalmente em células endoteliais e PGD₂ é o maior produto da via COX em vários tipos de células, incluindo macrófagos, células dendríticas e mastócitos ativados (FUNK, 2001; GONZALEZ-PERIZ; CLARIA, 2007).

Os neuropeptídeos liberados de neurônios sensitivos contribuem para as reações inflamatórias, constituindo a inflamação neurogênica. Essas substâncias podem ser armazenadas de forma ativa em vesículas secretórias (por exemplo, a substância P) ou geradas por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular (por exemplo,

por produtos de degradação de cininas, fibrinopeptídeo A, fibropeptídeo B e fibrina). A substância P é liberada pelos neurônios sensoriais e podem causar degranulação dos mastócitos, liberando histamina e outros mediadores e produzem contração da musculatura lisa e aumento da secreção de muco (BLACK, 2002).

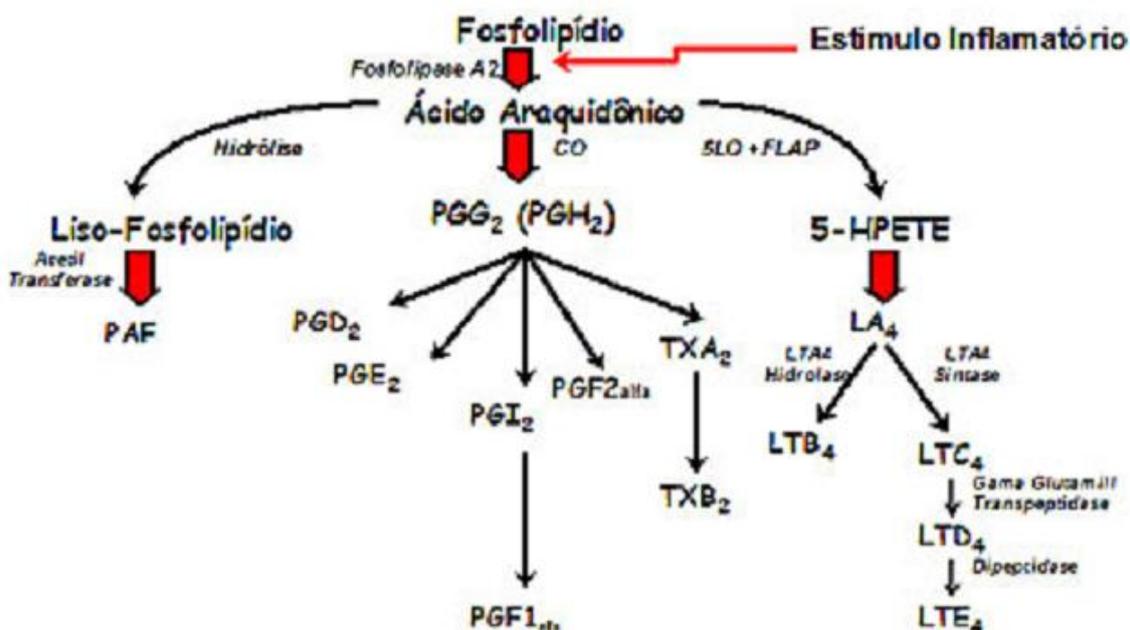
As citocinas representam um grupo diversificado de pequenas proteínas solúveis que quando secretadas por uma célula pode agir sobre a mesma célula, de forma autócrina, ou em outra célula, de forma parácrina. Através da ligação através dos receptores de superfície celular específicos, elas iniciam sinais que são essenciais para um amplo espectro de funções, incluindo a indução de respostas imunes, diferenciação e proliferação celular e apoptose (WANG *et al.*, 2009). Diante de um trauma tissular, as células liberam uma citocina denominada fator de necrose tumoral (TNF- α) que, por sua vez, induz a liberação de outras citocinas, podendo se destacar a interleucina 1-Beta (IL-1 β) e a interleucina 8 (IL-8). A IL-1 β promove a ativação da enzima cicloxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, enquanto que a IL-8 atua na liberação local de aminas simpatomiméticas (BASBAUM; JULIUS, 2006; FERREIRA, 2011). IL-1 é produzida em grandes quantidades pela membrana sinovial durante a inflamação, assim como por monócitos e macrófagos, não estando presente em tecidos normais (DINARELLO; WOLFF, 1993; TATAKIS, 1993). Consiste numa família de IL-1 α , IL-1 β e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), de forma que IL-1 α normalmente permanece no citosol enquanto IL-1 β e IL-1ra são secretados (DINARELLO, 1998). Foi encontrada pela primeira vez em 1982 no fluido sinovial de articulações de joelhos de pacientes com artrite reumatóide (AR), impulsionando o desenvolvimento de muitas pesquisas a partir da coleta do lavado sinovial articular (KOPP, 1998).

A via dos eicosanóides representa outro sistema que também passa a atuar quando as células inflamatórias são estimuladas ou lesadas, desempenhando um papel crítico em quase todas as etapas do processo inflamatório. Diferentemente da histamina, os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos, mas sim produzidos a partir de fosfolipídios de membranas (RANG *et al.*, 2007). O ácido araquidônico (AA), principal fonte dos eicosanóides, é um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro ligações duplas, sendo liberado a partir dos fosfolipídios de membrana através de uma reação catalisada pela enzima fosfolipase A2 (PLA2). Essa enzima é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular

promovida por diversos agentes, como espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEE *et al.*, 2003).

Uma vez liberado, o AA servirá como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das cicloxigenases (COX), que dá origem a formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PI) e tromboxanos (TXs), ou a via das lipoxigenases que levam à síntese dos leucotrienos e lipoxinas e outros compostos (Figura 2) (LEES *et al.*, 2004; KATZUNG, 2006; GILMAN *et al.*, 2006; RANG *et al.*, 2007; YEDGAR *et al.*, 2007).

Figura 3 – Biossíntese dos Produtos do Ácido Araquidônico.



Fonte: Dr. Pierre d'Almeida Telles Filho

A oxidação enzimática do ácido araquidônico produz uma variedade de metabólitos que apresentam importantes funções bioquímicas e fisiológicas. Entre estes metabólitos estão as prostaglandinas (PG), os leucotrienos (LT), o tromboxano (Tx) e a prostaciclina, metabólitos estes conhecidos coletivamente como eicosanóides.

Os prostanóides estão envolvidos em muitos processos fisiopatológicos, incluindo a regulação do tônus vascular, fertilidade, função das plaquetas e biologia do tumor (FUNK, 2001; GONZALEZ-PERIZ; CLARIA, 2007). Além disso, desempenham um papel fundamental na inflamação e, por muitos anos, as enzimas COX e seus produtos têm sido

considerados importantes agentes pró-inflamatórios (NARUMIYA, 2009). Assim, PGE₂ induz hiperalgesia, febre e exsudação pleural; PGD₂ facilita a inflamação alérgica, e PGI₂ desempenha um papel fundamental na vasodilatação, inibe a agregação plaquetária, e pode mediar o edema inflamatório, enquanto o TX é um pró-trombótico, prostanoide ativador de plaquetas (PÉREZ-SALA; LAMAS, 2001).

A natureza da ação dos prostanoídeos é altamente dependente do tipo de célula ou tecido-alvo. Assim, o mesmo composto pode provocar efeitos opostos em diferentes locais (NARUMIYA, 2009; SANDIG; PEASE; SABROE, 2007).

Além das duas isoformas de cicloxigenases (COX) existentes, que são representadas pela COX-1 e COX-2, pesquisas demonstraram a existência de uma terceira isoforma, a COX-3. Esta seria uma variante da COX-1 que tem sido implicada, em parte, na analgesia central e antipirese produzida pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (LEES *et al.*, 2004; PAPICH, 2008). A COX-3 foi isolada pela primeira vez no sistema nervoso central do cão e parece ser mais proeminente em cães do que em humanos e roedores (PAPICH, 2008).

Com exceção dos eritrócitos, a COX-1 está presente em quase todos os tipos de células sendo, portanto, chamada de constitutiva, levando à formação de PGs, principalmente relacionadas com ações fisiológicas como, proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Esta isoforma faz parte da constituição do trato gastrointestinal, sendo associada à produção de muco protetor e à inibição da secreção ácida gástrica, portanto, drogas que inibem essa enzima causam diversos distúrbios no trato digestivo. Nas plaquetas, a COX-1 está associada à síntese do tromboxano A₂, mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária, portanto, sua inibição está associada ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (BRICKS; SILVA, 2005; FRANCO *et al.*, 2006; HAZEWINKEL *et al.*, 2008; KUMMER; COELHO, 2002; LEES *et al.*, 2004; STEAGALL *et al.*, 2009).

Por outro lado, os produtos originados pela cisão do AA através da COX-2 levam, principalmente, à formação de PGs que participam de eventos inflamatórios, alérgicos e térmicos, uma vez que a expressão desta enzima ocorreria após estímulo inflamatório nas células migratórias e tecidos lesados sendo por isso denominada de indutiva (FRANCO *et al.*, 2006; HAZEWINKEL *et al.*, 2008; STEAGALL *et al.*, 2009). Todavia, vários estudos têm demonstrado que a COX-2 não está somente relacionada ao desenvolvimento do processo

inflamatório, mas também sendo responsável por ações fisiológicas que mantêm a homeostase em diferentes tecidos, como rins, ovário, útero, cartilagens, ossos e endotélio vascular (BRICKS; SILVA, 2005; HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006; KUMMER; COELHO, 2002; PAPICH, 2008; STEAGALL *et al.*, 2009).

As lipoxigenases, presentes principalmente no citosol, são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima do grupo é a 5-lipoxigenase, que atua sobre o ácido araquidônico produzindo o ácido 5 hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄). O LTA₄ pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou, em uma série de cisteinil leucotrienos, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. O LTB₄ é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (GOODMAN *et al.*, 2009), enquanto os cisteinilleucotrienos, principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos (GILMAN *et al.*, 2006; KATZUNG, 2006; RANG *et al.*, 2007).

O LTB₄ é um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN *et al.*, 2009). O leucotrieno B₄ (LTB₄) pode ser encontrado em exsudatos inflamatórios e ocorre nos tecidos em muitas condições inflamatórias, como artrite reumatóide (RANG *et al.*, 2007). Os cisteinil-leucotrienos provocam vasodilatação na maioria do leito vascular, vasoconstrição coronária e contração do músculo brônquico, sendo importantes na asma (SAKATA *et al.*, 2004; TRANDAFIR *et al.*, 2005). Sendo responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, os eicosanoides são potentes mediadores pró-inflamatórios, e a sua supressão tem sido um importante alvo terapêutico (KATZUNG, 2006).

1.10.4 Via da Heme oxigenase-1 (HO-1)

A heme oxigenase-1 é uma enzima sensível ao estresse produzido por vários agentes oxidantes. A sua expressão, em resposta a diferentes mediadores inflamatórios, pode contribuir para tratamento de inflamação. Além disso, ela tem efeitos protetores contra injúrias oxidativas em vários órgãos. Por essa razão, alguns fármacos utilizados no controle dos danos celulares, principalmente oxidativos, agem pela via da HO-1 (GRANGEIRO *et al.*, 2011).

A HO-1 é uma enzima microsossomal que catalisa a degradação do grupo heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM *et al.*, 1988). A ativação de HO-1, a forma induzida da HO, resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (ALCARAZ *et al.*, 2003). Sua regulação é fundamental para a homeostasia da célula (LAVROVSKY *et al.*, 1994; SOARES; BACH, 2009). Vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO e BVD, são capazes de modular o processo inflamatório. HO-1 é geralmente expressa em condições de estresse oxidativo, isquemia e reperfusão e é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, NO, endotoxinas e heme, o seu substrato, representando um mecanismo de defesa celular que pode modular a resposta inflamatória (BAKKEN *et al.*, 1972; CAMHI *et al.*, 1995; DOI *et al.*, 1999; YACHIE *et al.*, 2003).

1.10.5 Fármacos Utilizados na Dor e Inflamação

Os principais grupos de fármacos que são usados nos distúrbios inflamatórios são os glicocorticóides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES).

Os glicocorticóides são muito utilizados na terapia das doenças auto-imunes e na prevenção e/ou tratamento da rejeição de transplantes, e suas ações anti-inflamatórias se devem, principalmente, à inibição do gene da COX-2 e a indução da proteína lipocortina, a qual inibe a enzima fosfolipase A₂. Além disso, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1. Como exemplo de glicocorticóides, podem ser citados a hidrocortisona e dexametasona. Porém, a toxicidade associada à terapia crônica com os glicocorticóides limita o seu uso (RANG *et al.*, 2007).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) são fármacos que possuem um amplo espectro de indicações terapêuticas, tendo três principais efeitos: anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (RANG *et al.*, 2007). Estas drogas exercem suas ações principalmente através da inibição da ciclo-oxigenase (COX), a enzima chave que catalisa a conversão de ácido araquidônico nos diferentes tipos de eicosanóides (PGD₂, PGE₂, PGI₂, TXA₂), que são mediadores do processo inflamatório (BRUM-JÚNIOR, 2006).

Os AINEs podem ser classificados de acordo com sua seletividade às isoformas de COX. Aqueles que apresentam seletividade para ambas isoformas de COX são denominados inibidores de COX não seletivos. Já aqueles que apresentam maior grau de afinidade para COX-2 são os chamados inibidores de COX seletivos. De início, foi sugerido que os efeitos colaterais da maioria dos AINEs se deviam à inibição da COX-1, e os efeitos terapêuticos à inibição da COX-2. Entretanto, a partir da descoberta da expressão constitutiva da COX-2 em muitos tecidos, pode-se inferir que os inibidores de COX-2 também produziam efeitos colaterais graves (SPINOSA *et al.*, 2006). Este fato, juntamente com o objetivo de reduzir os efeitos adversos causados pelos inibidores de COX-1, impulsionou a busca por inibidores de COX-2 seletivos, e vários compostos novos tem sido obtidos através de intensas pesquisas. E, apesar da diminuição na incidência de complicações gástricas com o uso de inibidores COX-2 seletivos, esses fármacos também podem ocasionar efeitos adversos. Entre estes compostos destacam-se coxibes, os quais apresentam efeitos adversos, principalmente cardiovasculares, devido à redução da síntese vascular de PGI₂, o que parece ser em grande parte dependentes da COX-2 no sistema vascular (FUNK; FITZ GERALD, 2007; GROSSER; YU; FITZGERALD, 2010).

A indometacina destaca-se, dentre os AINEs não seletivos para COX-2, como importante ferramenta farmacológica atuando em modelos clássicos de nocicepção e inflamação utilizando animais em laboratório. Esse fármaco é derivado do ácido indolacético pertencente à categoria dos anti-inflamatórios não esteroidais, que apresenta propriedades anti-inflamatória, analgésicas e antipiréticas, já que inibe a enzima COX-2, necessária para a formação de PGs e outros autacóides (RAFFIN *et al.*, 2003). Inibe também a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares. É usado efetivamente em disfunções do sistema locomotor, porém, assim como outros AINES, é fortemente limitada pelos efeitos locais do sistema gastrointestinal, que podem gerar ulcerações e/ou hemorragias, devido à produção de grupos ácidos pelos AINES e pela inibição da síntese de PGs pela mucosa gástrica (BONINA *et al.*, 1997).

Sendo assim, apesar de os AINEs tradicionais serem bastante efetivos no tratamento da dor e inflamação, o uso crônico de tais medicamentos está associado a lesões do trato gastrointestinal, anormalidade de coagulação e problemas cardiovasculares como hemorragias (FABIOLA *et al.*, 2001; MASFERRER *et al.*, 1994; RAJAKARIAR; YAQOUB; GILROY, 2006).

Assim, observa-se que grande parte das drogas anti-inflamatórias disponíveis comercialmente exercem uma ampla gama de efeitos indesejáveis significativos que podem restringir seu uso. Atualmente, existe um grande interesse na procura por novos agentes terapêuticos a partir de fontes naturais (IWALEWA *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Estudos prévios da atividade anti-inflamatória da LCc, realizados por Vanderlei *et al.* (2010), demonstraram que a LCc apresentou efeito anti-inflamatório no modelo clássico de edema de pata e peritonite induzidos por carragenana. Portanto, no presente estudo foi verificado se a lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* apresenta efeitos nos processos inflamatórios (vascular e celular), induzido por agentes flogísticos, além de avaliar seu possível efeito edematogênico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Caracterizar parcialmente a estrutura da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* e avaliar o envolvimento da via da heme oxigenase-1 e das principais citocinas no seu efeito anti-inflamatório em modelos clássicos de inflamação.

2.2 Específicos

- Extrair as proteínas da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5;
- Isolar a lectina (LCc) presente no extrato protéico total da alga marinha *C. cupressoides* por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose;
- Determinar a massa molecular aparente da LCc por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) na ausência e presença de β -mercaptoetanol;
- Determinar a sequência dos aminoácidos da extremidade aminoterminal da LCc seguido a metodologia de degradação de Edman;
- Caracterizar parcialmente a estrutura da lectina de *C. cupressoides* por espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional de ^1H ;
- Avaliar os efeitos anti-inflamatórios da LCc utilizando o modelo de edema de pata frente aos indutores de inflamação carragenana e dextrana;
- Determinar a atividade enzimática da mieloperoxidase presente nos tecidos da pata dos animais;
- Avaliar os efeitos anti-inflamatórios da LCc na via da heme oxigenase (HO-1);
- Avaliar os efeitos anti-inflamatórios da LCc durante a fase vascular do processo inflamatório utilizando o modelo de edema de pata frente aos mediadores inflamatórios bradicinina, serotonina e histamina;
- Realizar as análises histológicas do tecido subplantar dos grupos tratados com LCc;

- Avaliar a participação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e da HO-1 nos tecidos da pata dos animais utilizando a técnica de imuno-histoquímica;
- Avaliar um possível efeito edematogênico da LCc utilizando o modelo de edema de pata.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Drogas e Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. Os reagentes utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho foram:

Albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250, tripsina, Tris (Hidroximetil) aminometano (Tris), DEAE-Celulose (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.).

Soluções e drogas usadas no ensaio de inflamação: Carragenana lambda tipo IV (Sigma, St. Louis, MO, USA); Dextrana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); Zinco protoporfirina IX (ZnPP IX) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); Dexametasona (Decadron®, Anápolis, GO, Brasil); Pentoxifilina (SEM, São Bernardo do Campo, SP, Brasil); Meclizina (APSEN, Santo Amaro, SP, Brasil); L-N-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) (Sigma, St. Louis, MO, USA); fostato de potássio monobásico, fostato de potássio dibásico, brometo de hexadecitrimetilamônio (HTAB) (Sigma®, USA), Histamina (Sigma®, USA); Hidrato de cloral (Vetec; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado pra anestésiar os animais.

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, com massa corpórea variando entre 190 e 240 g (n=6), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos em sala com temperatura ambiente adequada. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Os ensaios com os animais receberam a aprovação da Comissão de Ética em

Pesquisa Animal da UFC (CEPA n° 80/10) e seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, respeitando os princípios dos 3R's da experimentação animal ("reduction, replacement and refinement", ou seja, redução, substituição e refinamento).

3.1.3 Células Sanguíneas

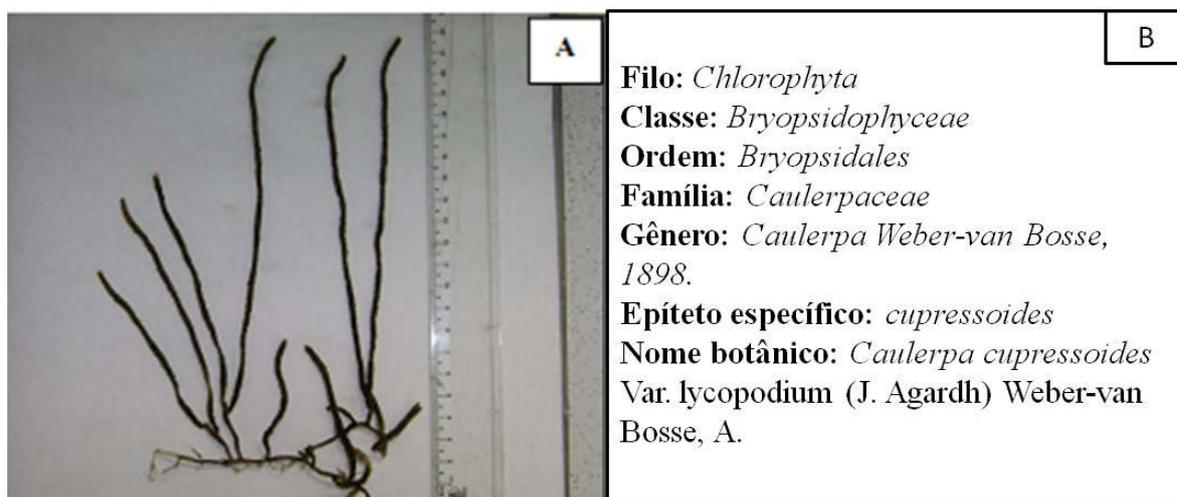
Para a determinação da atividade hemaglutinante, amostras de sangue foram obtidas de coelho albino adulto e sadio, mantido no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

3.1.4 Alga Marinha

A alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* foi coletada em rochas do mesolitoral na praia de Flexeiras no município de Trairí-Ceará durante o período de maré baixa (-0,1 a 0,1m). Posteriormente, conduzida em caixas isotérmicas e estocada (-20 °C) no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). No laboratório, as algas foram limpas para a retirada de epífitas e/ou organismos incrustantes, lavadas com água destilada e estocadas para posterior uso.

Um exemplar da alga, identificada como a espécie *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* Weber-van Bosse foi depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará com o número 4977 (Figura 4).

Figura 4 – Aspecto macroscópico da alga marinha *Caulerpa cupressoides* (A) e sua classificação taxonômica (B).



Fonte: Wendy Guiry in Guiry, 2012 e Vanderlei, 2008.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração e Isolamento da Lectina da Alga Marinha Verde *C. cupressoides*

O isolamento da lectina da alga marinha verde *C. cupressoides* foi realizada utilizando a metodologia descrita por Benevides *et al.* (2001) com modificações feitas por Vanderlei *et al.* (2010).

3.2.1.1 Preparação do Extrato Total

Após descongelamento e secagem da alga em papel de filtro, 500 g de alga fresca foram trituradas em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido e submetidas a extração das proteínas solúveis com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB), na proporção de 1:4 (m/v; alga:tampão). Após agitação constante de 4 horas, o homogenato foi filtrado em

tecido de nylon e em seguida centrifugado a 6.000 x g por 30 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido foi liofilizado, sendo denominado de extrato total (Figura 5).

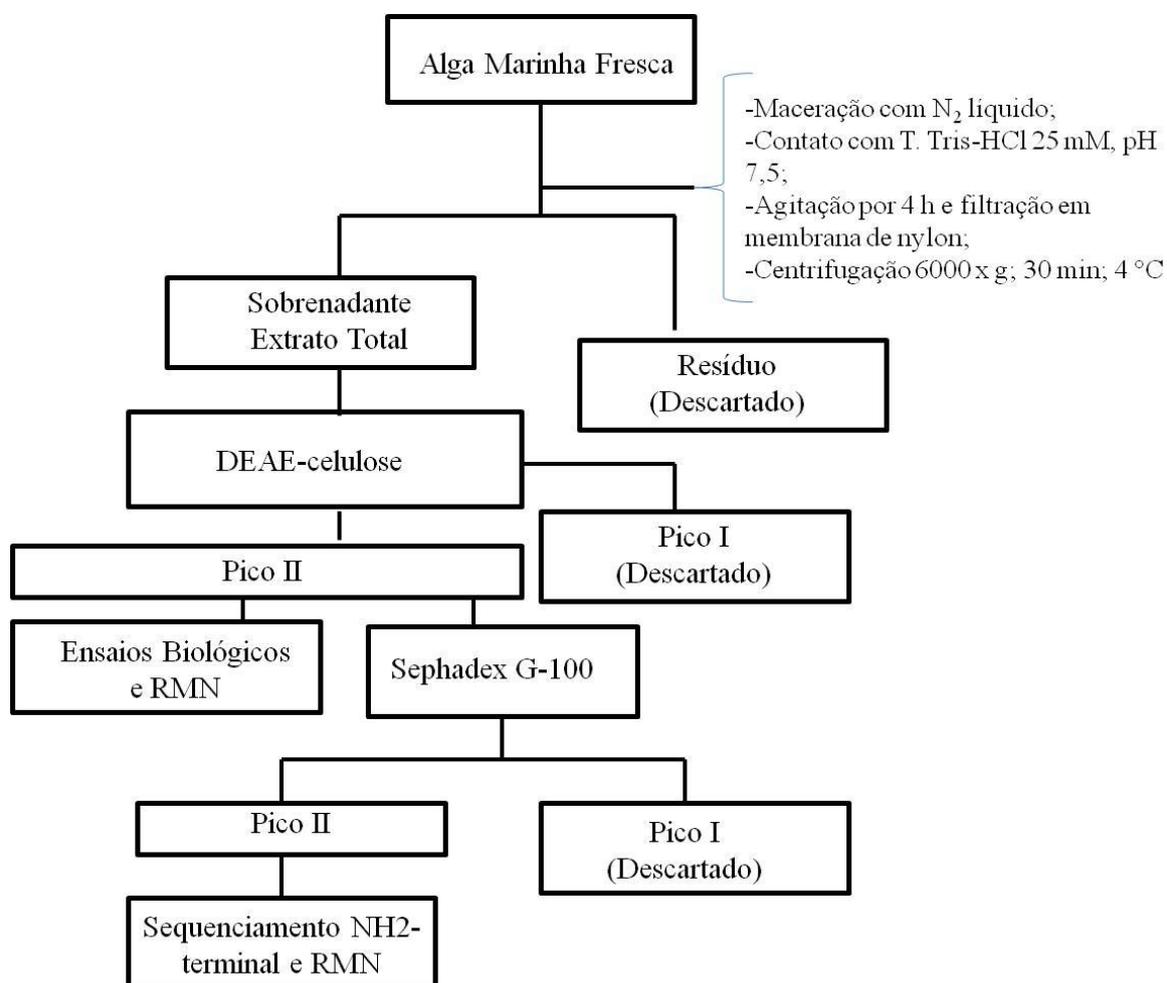
3.2.1.2 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

O extrato total obtido foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose. A coluna foi equilibrada com TB e o extrato, previamente dissolvido no mesmo tampão, foi aplicado na coluna. Após completa eluição da fração não retida na coluna com tampão de equilíbrio, foi realizada a eluição da fração adsorvida na matriz por adição de NaCl 0,5 M ao tampão de equilíbrio. Foi mantido um fluxo constante de 3mL/tubo/min e as absorbâncias foram lidas a 280 nm. A fração contendo atividade hemaglutinante foi reunida, dialisada contra água destilada e liofilizada. A lectina de *C. cupressoides* (LCc) foi então obtida (Figura 5).

3.2.1.3 Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-100

A fração ativa contendo atividade hemaglutinante obtida na cromatografia de DEAE-celulose foi submetida à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Sephadex G-100 equilibrada com TB. Após completa eluição da fração não retida na coluna com o tampão de equilíbrio, foi realizada a eluição da fração adsorvida na matriz por adição de glicose 0,1 M ao tampão de equilíbrio. Foi mantido um fluxo constante de 30 ml/ hora, coletando frações de 3 ml por tubo e as absorbâncias lidas a 280 nm. A fração retida (PII) após diálise contra ácido 37 acético 0,1 M seguida de diálise contra água destilada foi utilizada para determinação da atividade hemaglutinante e liofilizada para posteriores determinações.

Figura 5 – Esquema de Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde *C. cupressoides* (LCc).



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Esquema de extração e purificação da lectina de *C. cupressoides* segundo Benevides *et al.* (2001) com modificações realizadas por Vanderlei *et al.* (2010).

3.2.2 Determinação do Teor de Proteínas Totais

As concentrações de proteínas solúveis no extrato total e nas etapas de purificação da lectina foram determinadas segundo o método de Bradford (1976). Após 10 min de contato das amostras com o reagente de Bradford, à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 595 nm no espectrofotômetro. A concentração do teor de proteínas totais foi estimada com relação a uma curva padrão, utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA).

3.2.3 Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram feitos através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo, foram adicionados 100 µl de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo foram adicionados 100 µl da amostra e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100 µl de eritrócitos tripsinizados de coelho a 2% e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 min, conforme descrito por Ainouz *et al.* (1992). Posteriormente, o ensaio foi centrifugado a 2.000 x g por 30 s e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

3.2.4. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

Para os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, uma alíquota da fração contendo a hemaglutinina de *C. cupressoides*, encerrando 16 UH/ml, foi diluída com salina (NaCl 0,25 M) na proporção de 1:4 (v/v; amostra:tampão) e da solução resultante foram retiradas alíquotas de 100 µl que foram transferidas para tubos de ensaio contendo igual volume de soluções diluídas em série (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) a partir de soluções estoque de açúcares simples na concentração de 100 mM ou de glicoproteínas na concentração de 5 mg/ml (D-galactosamina, α-lactose, β-lactose, D-galactose, D-glucosamina, D-fucose, N-acetilglicosamina, Mucina, Sulfato de condroitina, Sulfato de condroitina (C-4S) e Sulfato de condroitina (C-6S). Os tubos permaneceram 60 min à temperatura ambiente e após este período foram adicionados 200 µl de suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tripsinizados. Os tubos foram deixados em repouso por mais 60 min à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 2.000 x g por 30 s.

A especificidade da lectina foi determinada observando-se os açúcares ou glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante e os resultados expressos com base na concentração mínima do composto que ainda foi capaz de causar inibição, segundo metodologia descrita por Benevides *et al.* (2001).

3.2.5. Eletroforese Unidimensional em Gel de Poliacrilamida

O grau de pureza das frações com atividade hemaglutinante foi acompanhado por eletroforese em condições desnaturantes (PAGE-SDS) em gel de poliacrilamida a 15%, na presença de β -mercaptoetanol, segundo o método de Laemilli descrito por Hames (1998).

As bandas proteicas obtidas foram reveladas mediante coramento com uma solução de Coomassie R-250 a 2% dissolvido em ácido acético, metanol e água na proporção de (10: 45: 45), contendo ácido pícrico 0,2 M (STEPHANO; GOULD; ROJAS-GALICIA, 1986). Os marcadores de migração eletroforética empregados foram: fosforilase b (97,0 kDa) albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.2.6 Caracterização Estrutural Preliminar da LCc

3.2.6.1. Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Aminoterminal (NH₂-terminal)

A seqüência de aminoácidos NH₂-terminal da LCc foi determinada de acordo com o método de degradação de Edman. A LCc foi dissolvida em água ultrapura e aplicada no seqüenciador automático (Shimadzu, modelo PPSQ-23A), sob condições recomendadas pelo fabricante.

A seqüência obtida foi comparada àquelas depositadas no banco de dados NCBI, por meio do pacote de algoritmos de busca BLAST-protein blast ([HTTP://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)).

3.2.6.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional ^1H (^1H -RMN)

O espectro de RMN da LCc foi obtido por detecção direta de ^1H em espectrômetro modelo Bruker DRX 600 MHz, utilizando uma sonda de tripla ressonância de 5 mm. A LCc (3 mg) foi dissolvida em 0,5 ml de D_2O a 99,9%. O experimento foi realizado a 25 °C com supressão de D_2O por pré-saturação. Posteriormente, foi realizada a análise do espectro obtido através do programa Spin work Versão 3.1.7, sendo os resultados obtidos comparados com o espectro da LCc obtida por cromatografia em Sephadex G-100.

3.2.8 Atividade Anti-inflamatória

Os estudos da atividade anti-inflamatória da LCc foram realizados utilizando ratos no modelo de edema de pata induzido por carragenana, dextrana, serotonina, histamina ou bradicinina. Todos esses ensaios foram realizados na ausência e presença do hapteno da LCc.

3.2.8.1 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana

O modelo do edema de pata induzido por carragenana (Cg) foi realizado segundo o método de Winter, Rislely e Nuss (1962). Cg (700 μg /pata; 100 μL) ou salina estéril (0,9%; 100 μL) foi injetada por via intraplantar (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. Grupos de seis animais foram tratados (i.v.) 30 min antes da Cg com LCc nas doses de 0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg (0,1 mL/100 g de peso). Dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.), um glicocorticoide sintético com potentes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ASSREUY *et. al.*, 2008), foi administrada, 1 h antes da Cg, como controle positivo.

Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 1, 2, 3, 4 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado pela variação do volume deslocado pela pata, calculando-se a diferença a partir do volume basal, tempo

zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com hidrato cloral (10%), e a porção inferior da pata foi extraída e fixada com formol tamponado para as análises histopatológicas.

3.2.8.2 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrana

O modelo do edema de pata induzido por dextrana foi realizado segundo o método de Maity *et al.* (1998). Dextrana (400 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. Grupos de seis animais foram tratados (i.v.) 30 min antes da Dextrana com LCc nas doses de 0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg (0,1 mL/100 g de peso).

Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado pela variação do volume deslocado pela pata, calculando-se a diferença a partir do volume basal, tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com hidrato cloral (10%).

3.2.8.3 Edema de Pata Induzido por Histamina, Bradicinina e Serotonina

O edema de pata com histamina, serotonina ou bradicinina foi realizado conforme metodologia descrita por Maling *et al.* (1974) com algumas modificações. A histamina (100 µg/pata, 100 µL), bradicinina (30 µg/pata, 100 µL) ou serotonina (20 µg/pata, 100 µL) foram injectados s.c. na pata posterior direita de ratos. Os animais foram pré-tratados com LCc (1,0 mg/kg; i.v.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%; 100 µL) 1 hora antes dos estímulos. Os animais controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril (NaCl 0,9%; 100 µL). Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado pela variação

do volume deslocado pela pata, calculando-se a diferença a partir do volume basal, tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com hidrato cloral (10%).

3.2.8.4 Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios (POSADAS *et al.*, 2004).

Para dosagem, 50 a 70 mg de tecido da pata, depois de pesados, foram adicionados em tampão fosfato de potássio 50 mM com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido/mL) e posteriormente homogeneizados em um homogeneizador de tecidos (Politron). A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 min a 4 °C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO/mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley *et al.* (1982), utilizando peróxido de hidrogênio a 1% como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO é definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 min a 22 °C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado, ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como unidades da atividade de MPO/mg de tecido.

3.2.8.5 Análise do Envolvimento da Via da Heme oxigenase-1 (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LCc

A análise do envolvimento da via da heme oxigenase-1 (HO-1) na atividade anti-inflamatória da LCc foi realizada segundo a metodologia descrita por Freitas *et al.* (2006), com algumas modificações (VANDERLEI *et al.*, 2011). Ratos foram pré-tratados com zinco protoporfirina (ZnPP) IX, inibidor da enzima HO-1, (3 mg/kg; s.c.), passada 1 h, foram, então, tratados com LCc (1,0 mg/kg; i.v.). Após 30 min, Cg (700 µg/pata; 100 µL; i.pl.) foi

injetada. Um grupo adicional recebeu salina estéril (0,9%; 100 µL; i.pl.). Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado pela variação do volume deslocado pela pata, calculando-se a diferença a partir do volume basal, tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com hidrato cloral (10%).

3.2.8.6 *Análise Histológica do Tecido Subplantar*

Na 4ª hora após a indução do edema com carragenana, os animais tratados com a LCc (0,1, 1,0 ou 10 mg/kg) foram eutanasiados com cloral hidratado (10%). Para realização da análise histológica, amostras do tecido subplantar foram retiradas das patas e fixadas em formol 10% tamponado por 24 h e, posteriormente, desidratadas e emblocados em parafina, sendo submetidos a cortes de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HSU; RAINE, 1981) e montados em lâminas de vidro. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Leica acoplado ao computador com aumento de 100 x, atribuindo escores de 0 a 4 de acordo com a intensidade dos achados, a saber: 0 - ausência de infiltrado celular inflamatório, 1 - infiltrado celular inflamatório discreto, 2 - infiltrado celular inflamatório leve, 3 - infiltrado celular inflamatório moderado, 4 - infiltrado celular inflamatório intenso, observados no tecido epitelial e no tecido conjuntivo.

3.2.8.7 *Ensaio de Imunohistoquímica*

Para a realização do ensaio de imuno-histoquímica foi utilizado o grupo tratado com a dose de LCc (10,0 mg/kg) que apresentou efeito anti-inflamatório significativo. Os animais foram submetidos à eutanásia com hidrato cloral 10%. Amostras do tecido subplantar foram retiradas das patas e fixadas em formol 10% tamponado por 24 h e, posteriormente, desidratadas e emblocados em parafina, sendo submetidos a cortes de 5 µm de espessura e

montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co®, St Luis, MO, EUA).

Os cortes foram submetidos aos anticorpos primários TNF α , IL-1 β , IL-6 e HO-1 utilizando método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Resumidamente, a técnica consistiu nos seguintes passos: os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados em xilol (dois banhos durante 10 min cada), imersos em três passagens de álcool absoluto, lavados em água corrente e, posteriormente, foi submetido a uma passagem em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com citrato em pH 6,0 durante 30 minutos à temperatura de 99 °C. Após retornar à temperatura ambiente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-HO-1, anti-TNF α , anti-IL-1 β ou anti-IL-6 ou (Santa Cruz), por 60 min à temperatura ambiente, na diluição de 1:50 em PBS com albumina sérica bovina (PBS-BSA), e, posteriormente, lavados com solução de PBS.

Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário LSAB Kit (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita incubação em solução cromógena preparada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), durante 10 minutos em câmara escura. Controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, porém o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5 %. Os cortes foram então lavados em água corrente e, em seguida, com água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina, seguida de desidratação em uma série de concentrações de álcool, diafinizadas em xilol e, por fim, a lâmina foi colocada. Como controle positivo foi utilizado corte de tecido que foi submetido ao edema por carragenana.

As lâminas foram avaliadas em microscópio KIKON Eclipse E200, e fotografadas em microscópio LEICA acoplado a computador com aumento de 400 x. Os parâmetros de positividade da marcação imunohistoquímica do antígeno em todos os cortes incluídos consistiram nas células que exibiram coloração acastanhada no seu citoplasma, independente da intensidade de imunomarcação.

3.2.8.8 Avaliação do Efeito Edematogênico da LCc

3.2.8.8.1 Ensaio de Edema de Pata Induzido por LCc

Para avaliar o possível efeito edematogênico da LCc em ratos, LCc (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg), foi injetada na pata posterior direita dos animais (100 µL /pata; n= 6).

Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado pela variação do volume deslocado pela pata, calculando-se a diferença a partir do volume basal, tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com hidrato cloral (10%).

3.2.8.8.2 Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LCc

A modulação farmacológica foi realizada para investigar quais mediadores inflamatórios estão envolvidos no efeito edematogênico da LCc, quando esta é aplicada diretamente na pata, segundo metodologia descrita por Araújo, *et al.* (2011). Para isso, LCc (10,0 mg/kg; 100 µL/pata) foi injetada na pata direita traseira dos ratos (n=6) 30 min ou 1 hora após o tratamento com os seguintes fármacos: indometacina (5 mg/kg; s.c.; 1 h), um potente inibidor não seletivo da enzima ciclo-oxigenase; dexametasona (1mg/kg; s.c.; 1 h), um anti-inflamatório e imunossupressor, L-NAME (30 mg/kg; i.p.; 30 min), um inibidor não específico de óxido nítrico sintase (ASSREUY *et al.*, 2009); pentoxifilina (90 mg/kg; s.c.; 1 h), um inibidor de IL-1 e TNF- α (CUNHA *et al.*, 2000) ou meclizina (40 mg/kg; s.c.; 1 h), um inibidor do receptor H₁ da histamina (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

O grupo controle recebeu salina estéril 0,9% (s.c.) no mesmo volume da LCc (10,0 mg/kg; s.c.; 100 µL). Os volumes da pata de cada animal foram medidos através de hidropletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h após a administração do agente inflamatório. O

edema foi calculado pela variação do volume deslocado pela pata, calculando-se a diferença a partir do volume basal, tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com hidrato cloral (10%).

3.2.9. Análises Estatísticas

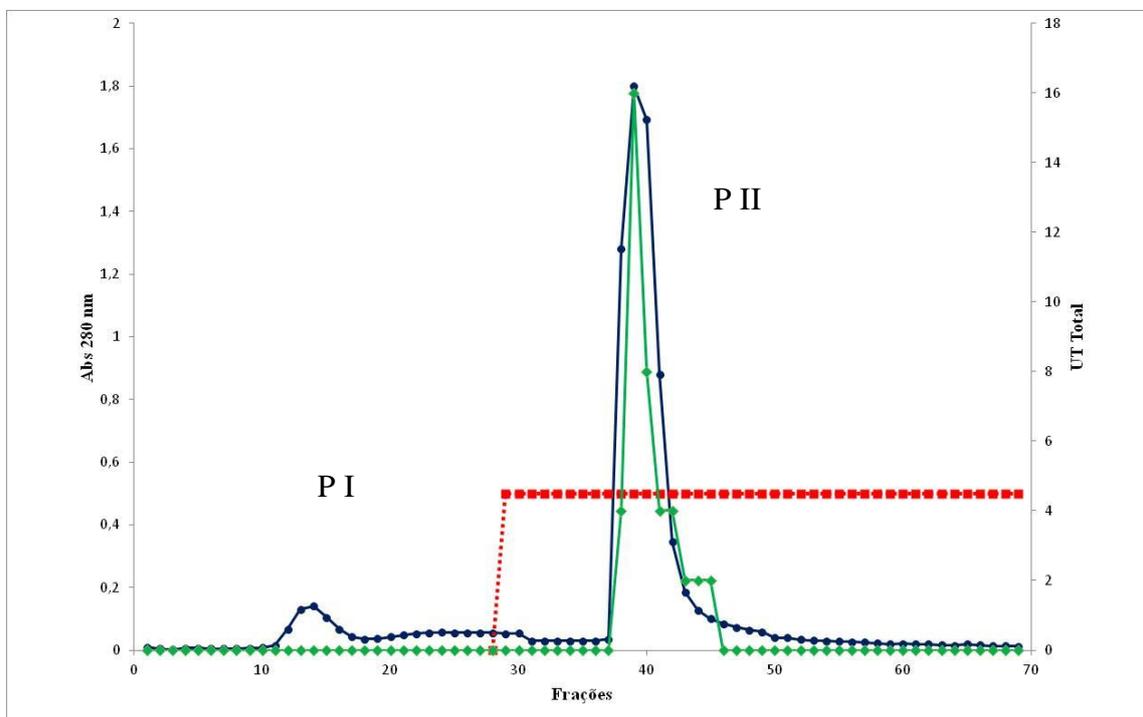
Os resultados foram expressos como média± E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos, foi realizada Análise de Variância (Two-way ANOVA) e seguida pelo teste de Bonferroni. À análise histopatológica, os dados foram expressos em medianas e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para diferenciação estatística. Foram considerados significantes os resultados com $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e Purificação da Lectina da Alga Marinha Verde *Caulerpa cupressoides*

A lectina da alga marinha *Caulerpa cupressoides* (LCc) foi purificada por aplicação do extrato total em cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose. O procedimento de troca-iônica mostrou a presença de dois picos protéicos, onde o primeiro pico (P I) não retido na coluna e livre de atividade hemaglutinante foi eluído com o tampão de equilíbrio da coluna (TB). O segundo pico (P II) foi eluído com o mesmo tampão, contendo 0,5 M de NaCl apresentando-se levemente pigmentado e com atividade hemaglutinante (Figura 6).

Figura 6 – Cromatografia de Troca Iônica em Resina de DEAE-Celulose do Extrato Total da Alga *C. cupressoides*.

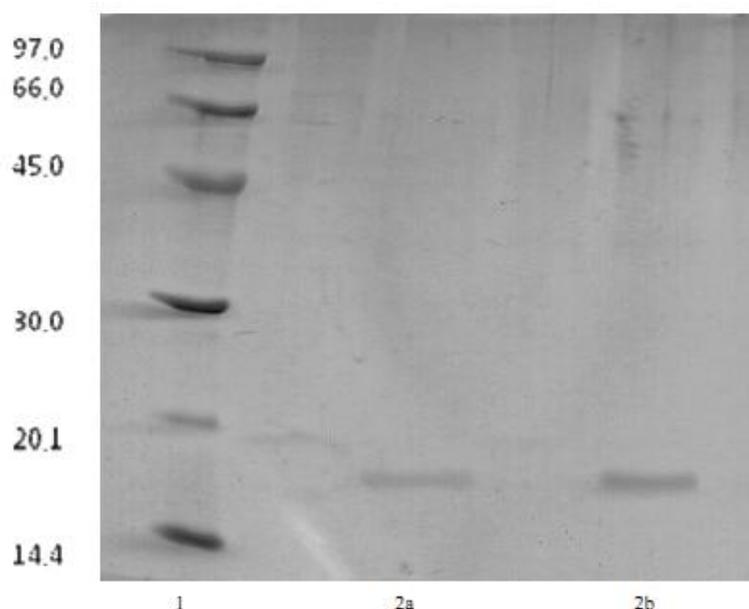


Fonte: Ismael N. L. de Queiroz e Renata L. C. Rivanor.

O pico não retido (P I) foi eluído com o tampão de equilíbrio (TB) e o pico adsorvido na coluna (P II), eluído com tampão TB contendo NaCl 0,5 M. Foram coletadas as frações 3 mL/tubo. (●-●) Absorbâncias a 280 nm; (◆-◆) Atividade hemaglutinante total (UH Total). (■) Eluição das frações com o TB contendo NaCl 0,5 M.

A fração protéica contendo atividade hemaglutinante (PII-DEAE), apresentou um rendimento de 36% do extrato total. Este rendimento também é considerado semelhante ao obtido para a espécie de alga marinha vermelha *P. capillacea* por, Silva *et al.* (2008) que obtiveram um rendimento de 38%. Esse rendimento foi superior quando comparado ao obtido por Lima *et al.* (2005) para a lectina da alga *Gracilaria córnea* cujo rendimento de 4,5%. A eletroforese em condições desnaturante (PAGE-SDS) em presença do agente redutor β -mercaptoetanol demonstrou uma única banda eletroforética sugerindo o grau de pureza da LCc (Figura 7).

Figura 7 – Eletroforese (PAGE-SDS) do PI- DEAE da Alga Marinha Verde *C. cupressoides*.



Fonte: Ismael N.L. de Queiroz

Eletroforese PAGE-SDS na presença de β -mercaptoetanol da LCc. 1. Marcadores [fosforilase b (97,0 kDa) albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa)]; 2. LCc na presença de 2-mercaptoetanol (2a: 10 μ L e 2b: 20 μ L).

A eletroforese apresentou uma banda proteicas com peso molecular aproximado de 17 kDa semelhante ao obtido por Vanderlei *et al.* (2010).

4.1.2 Caracterização Estrutural Preliminar da LCc

4.1.2.1. Sequenciamento dos Aminoácidos da Extremidade Aminoterminal (NH_2 -terminal)

Na determinação do sequenciamento de resíduos de aminoácidos da extremidade amino-terminal foi observada que a proteína LCc apresentou 31 resíduos, que apresentaram a seguinte sequência: **KGTCALDDRLEPGFARAGEAFRQTTAKDATS**. Após o alinhamento dessa extremidade NH_2 -terminal com sequências protéicas não redundantes através do algoritmo BLASTp, foi observado que LCc apresenta identidade com as proteínas

das microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus tauri* e *Volvox carteri f. nagariensis* (Figura 8). Entretanto, das referidas proteínas a que apresentou uma maior identidade com a sequência NH₂-terminal obtida para a LCc foi a da proteína da alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 9). Essas duas proteínas apresentam 43% de identidade nas suas extremidades NH₂-terminal, diferindo nas posições de dezesseis resíduos de aminoácidos (Figura 9).

Figura 8 – Alinhamentos Encontrados para a Sequência NH₂-terminal da LCc.

Sequences producing significant alignments:		
Accession	Description	Max ident
XP_001689481.1	predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii] >gb EDP09219.1 predicted	43%
XP_003077920.1	unnamed protein product [Ostreococcus tauri] >emb CAL52660.1 unna	42%
XP_002949293.1	hypothetical protein VOLCADRAFT_89596 [Volvox carteri f. nagariensis]	39%

Fonte: [HTTP://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)

Figura 9 – Alinhamento do NH₂-terminal da LCc com NH₂-terminal da Proteína de *Chlamydomonas reinhardtii*

```
>ref|XP_001689481.1| UGM predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii]
gb|EDP09219.1| G predicted protein [Chlamydomonas reinhardtii]
Length=239
```

GENE ID: 5715144 CHLREDRAFT_102075 | hypothetical protein
[Chlamydomonas reinhardtii] (Over 10 PubMed links)

Score = 26.2 bits (56), Expect = 2.3, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 12/28 (43%), Positives = 16/28 (57%), Gaps = 0/28 (0%)

```
Query 2 GTCALDDRLEPGFARAGEAFRQTTAKDA 29
G C + ++EPG R F QTTA+ A
Sbjct 198 GMCVVVAQVEPGVFRDLNNEFMQTTARGA 225
```

```
Query 2 GTCALDDRLEPGFARAGEAFRQTTAKDA 29
G C + ++EPG R F QTTA+ A
Sbjct 198 GMCVVVAQVEPGVFRDLNNEFMQTTARGA 225
```

Fonte: (NCBI; BLASTp).

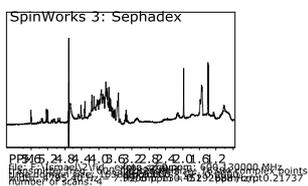
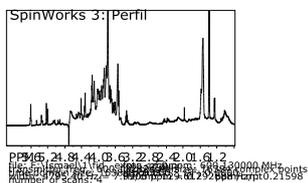
Query 2: sequência da LCc; Subjet 198; sequência da *Chlamydomonas reinhardtii*. Os resíduos de aminoácidos que se apresentaram idênticos entre as duas sequências estão marcados em amarelo.

4.1.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional ^1H (^1H -RMN)

Além da determinação do seqüenciamento de resíduos de aminoácidos da extremidade amino-terminal da proteína LCc, também foi obtido um espectro de RMN da LCc por detecção direta de ^1H em espectrômetro, com o intuito de determinar parcialmente a estrutura da proteína LCc, obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (PII-DEAE) e por procedimentos de cromatografia em DEAE-celulose seguido de filtração em gel de Sephadex G-100 (PII-Sephadex G-100).

Na realização do estudo comparativo da LCc purificada por Sephadex G-100 e obtida por DEAE-celulose, foi demonstrado uma similaridade entre os sinais obtidos em ambos os espectros (Figura 10).

Figura 10 – Espectros 1D de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN em 600 MHz) da Lectina da Alga *C. cupressoides* Obtida por Procedimentos Cromatográficos de DEAE-celulose (Perfil A) e Sephadex G-100 (Perfil B).



Os espectros de ^1H -RMN das amostras foram obtidas utilizando uma frequência de 600 MHz à uma temperatura de 298 K (25 °C).

Como os espectros de RMN obtidos para LCc (PII-DEAE-celulose e PII SEPHADEX) apresentaram similaridade, foi decidido utilizar a LCc obtida por DEAE-celulose nos estudos posteriores (ensaios de inflamação).

4.2 Atividade Anti-inflamatória

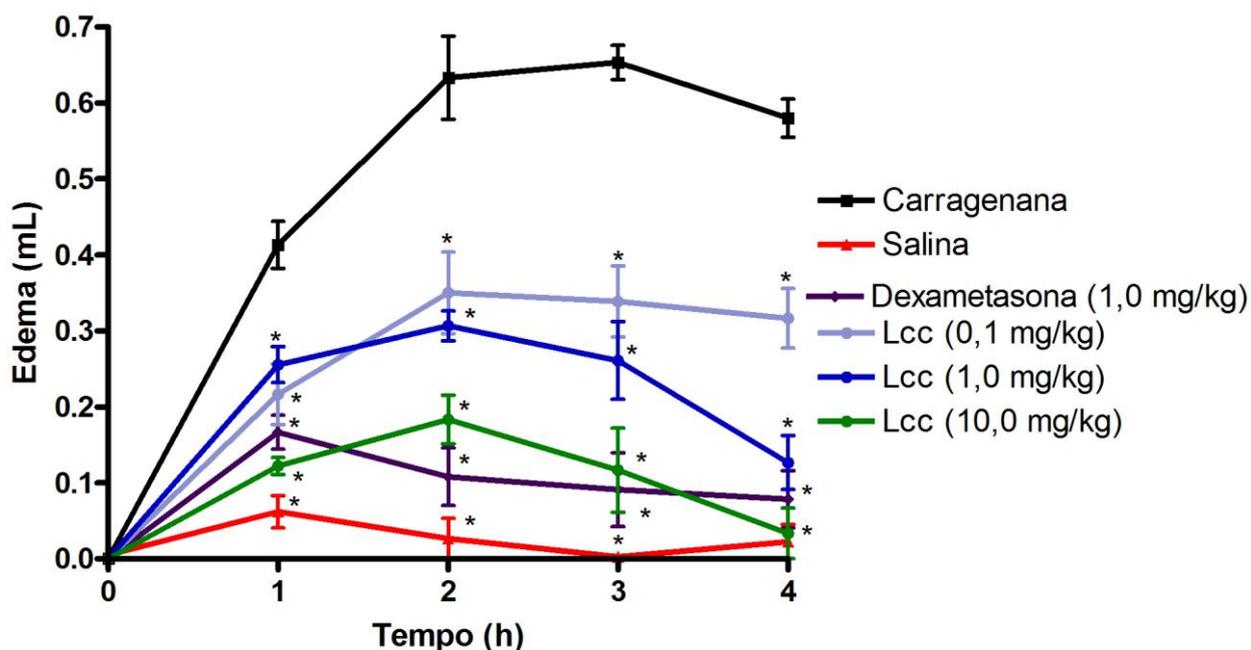
Estudos anteriores relacionados à nocicepção da LCc foram realizados por Vanderlei *et al.* (2010). Portanto, o presente trabalho visou avaliar a LCc no processo inflamatório.

4.2.1 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Carragenana

No ensaio de edema de pata, induzido por Cg, os resultados obtidos mostraram que a aplicação da Cg (700 μg /pata; 100 μL) provocou um intenso edema, a partir da 1ª hora após o estímulo, alcançando um nível máximo na terceira hora (0,65 \pm 0,04 mL). O pré-tratamento com LCc (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg; i.v.) reduziu o edema de forma significativa ($p < 0,05$) em todas as horas após a administração de Cg, quando comparado ao grupo controle negativo (Cg) (Figura 11).

O edema de pata induzido pela injeção de carragenana (Cg) em ratos é caracterizado por quatro fases distintas. Na 1ª fase ocorre a liberação de histamina e serotonina, enquanto que a 2ª e 3ª fase consistem na liberação de citocinas e prostaglandinas, respectivamente. A 4ª hora é caracterizada pela ocorrência de tromboxanos e leucotrienos (DI ROSA, 1972; LO *et al.*, 1982; MORRIS *et al.*, 2003). A infiltração de neutrófilos pode ser avaliada pela determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nas secções das patas, em que os níveis teciduais de MPO correlacionam-se com a severidade da doença (POSADAS *et al.*, 2004).

Figura 11 – Efeito da Administração de LCc da Alga *C. cupressoides* no Modelo de Edema de Pata Induzido por Carragenana (Cg).



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Cg (700 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. Antes do estímulo, os animais foram pré-tratados com solução salina estéril 0,9% (s.c.), dexametasona (1,0 mg/kg) ou LCc (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg; i.v.; 30 min). Os pontos sobre as linhas representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

A LCc apresentou acentuada inibição do edema de pata induzido por Cg em todos os tempos avaliados. Na dose de 0,1 mg/kg, a LCc inibiu em 47,58; 44,74; 48,13 e 45,40%, respectivamente. A dose de 1,0 mg/kg, inibiu o edema em 38,17; 51,58; 60,03 e 78,16%, respectivamente. E, por último, a dose de 10,0 mg/kg inibiu o edema em 70,43; 71,05; 82,14 e 94,25%, respectivamente. Com relação ao controle positivo dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.), esta também apresentou uma inibição do edema em 59,72; 82,92; 86,07 e 86,47%, respectivamente, para todos os tempos avaliados.

Silva *et al.* (2010a), utilizando a lectina da alga marinha vermelha *P. capillacea* em estudos de inflamação, demonstraram que a referida lectina foi capaz de inibir o edema de pata induzido por Cg em todos os tempos avaliados. O mesmo foi demonstrado com a lectina da alga vermelha *S. filiformis* que também foi capaz de inibir o edema de pata induzido por Cg em todas as fases do processo edematogênico (ABREU, 2012).

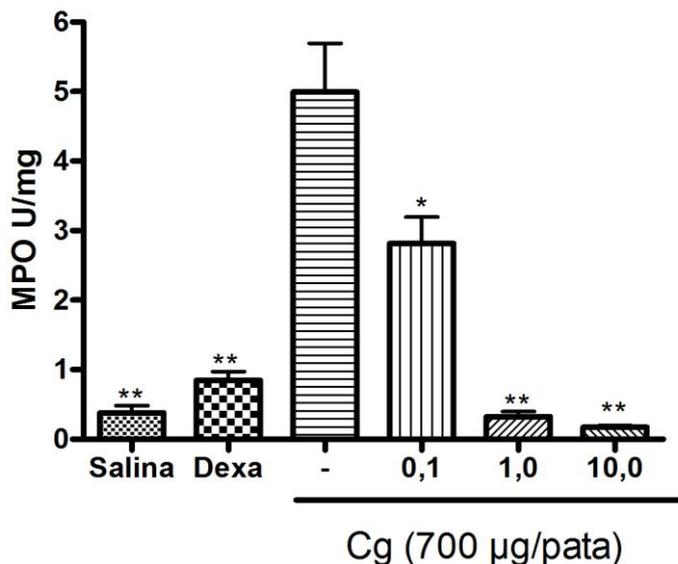
A lectina da alga marinha vermelha *H. cervicornis*, quando administradas por via i.v., também foi capaz de inibir a formação do edema de pata induzido por Cg a partir da 1ª h (BITENCOURT *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Vanderlei *et al.* (2010), realizando estudos preliminares de ensaio de edema de pata com a LCc e utilizando somente a dose de 9,0 mg/kg, observaram uma redução do edema de pata induzido por Cg (90%) somente para a 2ª e 3ª h. Esses resultados divergiram dos obtidos no presente estudo, tendo em vista que foi demonstrado uma redução significativa para todas as doses testadas (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg) ao longo de todo o período avaliado (da 1ª até a 4ª h).

4.2.2 Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase

Para confirmar o efeito anti-inflamatório da LCc, a atividade da MPO foi determinada nos homogenatos dos tecidos das patas de ratos, que foram previamente tratados por via intravenosa com a referida lectina (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg). Os resultados obtidos demonstraram uma redução significativa da atividade da MPO de maneira dose-dependente, na ordem de 43,66; 93,55 e 96,56%, respectivamente. Com relação ao controle positivo, dexametasona (1,0 mg/kg), houve uma redução significativa da MPO de 83,08%, não diferindo significativamente, quando comparada às doses de 1,0 e 10 mg/kg da LCc e ao grupo salina (Figura 12).

Figura 12 – Estudo da Atividade da Mieloperoxidase (MPO) sobre o influxo celular no Tecido das Patas com Processo Inflamatório Induzido por Carragenana (Cg).



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Cg (700 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. Antes do estímulo, os animais foram pré-tratados com solução salina estéril 0,9% (s.c.), dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.; 1 h) ou LCc (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg; i.v.; 30 min). As atividades enzimáticas foram expressas em unidades de MPO (U/mg dos tecidos). As barras representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparada ao grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

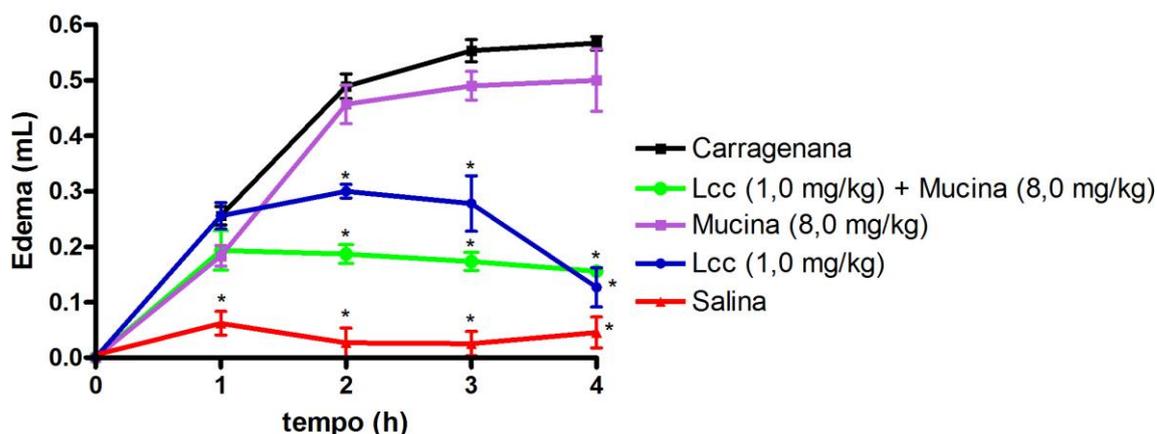
A MPO vem sendo utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios (POSADAS *et al.*, 2004).

De maneira semelhante ao observado na literatura, os níveis de MPO obtidos neste trabalho, também mostraram-se reduzidos para o grupo submetido ao tratamento com dexametasona, um glicocorticoide sintético com potentes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ASSREUY *et al.*, 2008), considerada uma das drogas mais prescritas no mundo para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas (LÖWENBERG *et al.*, 2008; TISCHNER; REICHARDT, 2007).

A atividade hemaglutinante da LCc contra eritrócitos de coelho tripsinizados, na presença do seu hapteno mucina (9,76 mg/L), mostrou-se completamente inibida. No entanto,

quando a LCc (1,0 mg/kg) foi avaliada com relação a sua atividade antiedematogênica, associada ao seu açúcar inibidor mucina (8,0 mg/kg), não foi capaz de perder a sua capacidade de reduzir o edema, mostrando assim um efeito contrário, ou seja, potencializou seu efeito antiedematogênico. No entanto, quando a mucina foi administrada isoladamente, ela não foi capaz de reduzir o edema. Esses resultados sugerem que o sítio da LCc responsável por atividade antiedematogênica seja diferente do seu sítio de ligação ao açúcar inibidor da sua atividade hemaglutinante (Figura 13).

Figura 13 – Efeito da Lectina Associada ao Seu Ligante Mucina Sobre o Edema de Pata Induzido por Cg.



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Cg (700 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. 30 min antes do estímulo, os animais foram pré-tratados com solução salina estéril 0,9% (s.c.), LCc (1,0 mg/kg; i.v.), LCc (1,0 mg/kg; i.v.) associada ao seu ligante mucina (8,0 mg/kg; i.v.) ou mucina (8,0 mg/kg; i.v.). Os pontos sobre as linhas representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Contrariamente aos resultados obtidos neste trabalho, Silva *et al.* (2010a), realizando estudos de atividade anti-inflamatória para a lectina da alga vermelha *P. capillacea* também em presença do seu hapteno mucina (1,25 mg/mL), demonstraram que a referida lectina perdeu a sua capacidade de reduzir o edema de pata induzido por Cg.

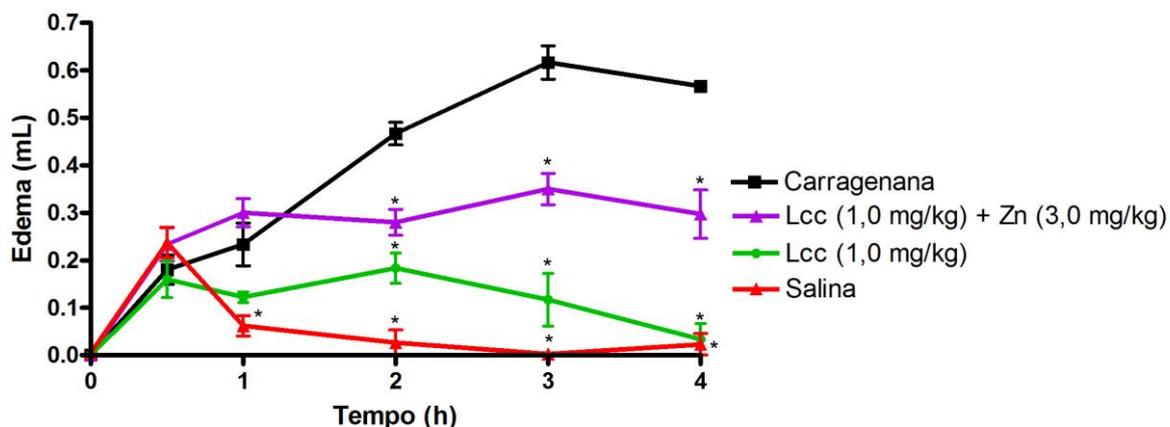
Bitencourt *et al.* (2008) realizaram estudos de atividade anti-inflamatória da lectina obtida alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* também utilizando a mucina na avaliação da inibição do efeito antiedematogênico dessa lectina. Os resultados obtidos demonstraram que a referida lectina perdeu a sua capacidade de reduzir o edema de pata induzido por Cg.

4.2.3 Análise do Envolvimento da Via da Heme oxigenase-1 (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LCc

Vários estudos têm demonstrado que a expressão da via da heme oxigenase-1 tem consequências anti-inflamatórias (PAINÉ *et al.*, 2010). Essa enzima é sensível ao estresse produzido por vários agentes oxidantes e, juntamente com seus produtos, diminui o processo inflamatório em modelo de inflamação induzida por Cg em ratos (WILLIS *et al.*, 1996). Com base nos dados da literatura sobre a ação da HO-1, avaliamos se o efeito anti-inflamatório da LCc envolve a via da HO-1. Para isso, utilizou-se zinco protoporfirina (ZnPP) IX, que é um inibidor específico da HO-1, resultando na inibição dessa via. Ele age como um inibidor competitivo do grupo heme pertencente à estrutura da protoporfirina IX que tem a ela ligada um átomo de ferro no seu estado ferroso (FREITAS *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2001).

Como mencionado anteriormente neste estudo, a LCc (1,0 mg/kg) inibe o edema de pata induzido por Cg ao longo de todo período avaliado (1^a até a 4^a hora). Portanto, na presença de ZnPP IX, houve uma alteração do efeito anti-inflamatório da LCc, reduzindo a sua capacidade anti-inflamatória na 3^a e 4^a hora. Esses resultados sugerem que a atividade da HO-1 está envolvida no efeito anti-inflamatório dessa lectina (Figura 14).

Figura 14 – Análise do Envolvimento da Via da Heme oxigenase (HO-1) na Atividade Anti-inflamatória da LCc.



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Antes de receber a injeção de Cg (700 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*, alguns grupos de animais receberam a LCc (1,0 mg/kg; i.v.) com ou sem ZnPP IX (3,0 mg/ s.c.) Os pontos representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg (ANOVA; Teste de Bonferroni)

A sua expressão, em resposta a diferentes mediadores inflamatórios, pode contribuir para tratamento de inflamação. Além disso, ela tem efeitos protetores contra injúrias oxidativas em vários órgãos devido à sua sensibilidade a vários agentes oxidantes. Por essa razão, alguns fármacos utilizados no controle dos danos celulares, principalmente oxidativos, agem pela via da HO-1 (GRANGEIRO *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos obtidos da lectina da alga marinha vermelha *S. filiformis*, isolada por Abreu (2012), em que a lectina em combinação com ZnPP IX foi capaz de reverter o efeito anti-inflamatório da lectina isolada.

4.2.4 Ensaio de Edema de Pata Induzido por Dextrana

Dextrana é considerada um agente osmótico clássico (LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982), que promove a liberação de aminas vasoativas, como histamina, serotonina e bradicinina, causando um edema osmótico, sendo caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular (LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982).

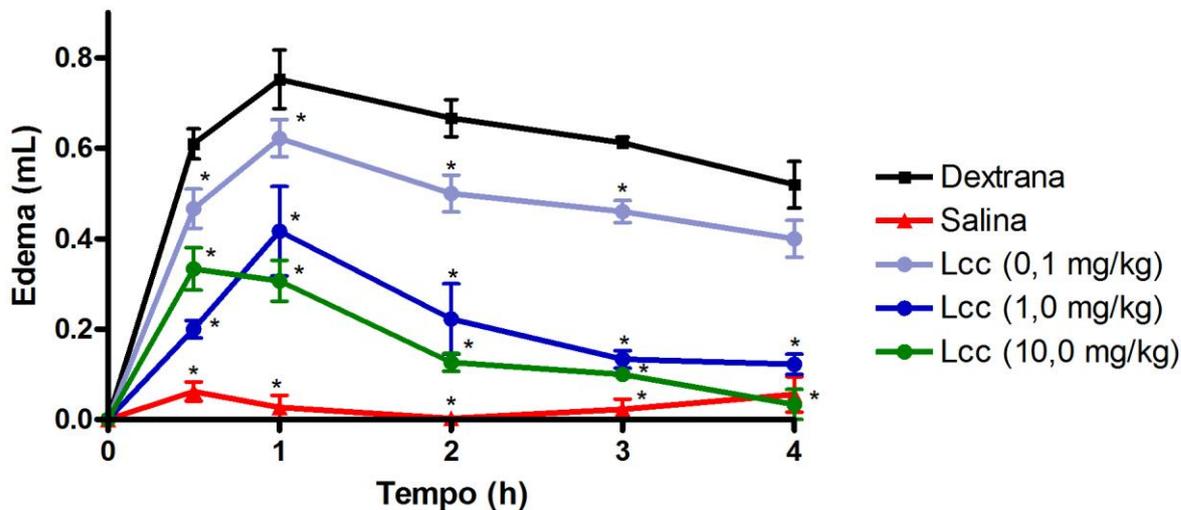
A administração da Dextrana (400 µg/pata; 100 µL; s.c.), semelhante a Cg, também induziu um edema significativo com volume máximo de $0,76 \pm 0,16$ mL, após a 1ª hora do estímulo, quando comparado ao grupo salina. A administração da LCc nas doses de 0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg, 30 min antes do edema induzido por dextrana, inibiu significativamente o edema ao longo de todo período avaliado (30 min, 1, 2, 3 e 4 h). A LCc avaliada no tempo de 1 hora, inibiu significativamente e de forma dose-dependente o edema em 17,34% na dose de 0,1 mg/kg; em 44,65% na dose de 1,0 mg/kg e em 59,26% na dose de 10,0 mg/kg (Figura 15).

O modelo de edema de pata induzido por dextrana permite a avaliação da atividade de novos agentes anti-inflamatórios em processos mediados predominantemente por histamina (LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982).

Desta forma, pode-se sugerir neste trabalho, que a LCc pode estar relacionada com eventos vasculares da inflamação, como o edema osmótico, envolvendo possivelmente a supressão da liberação de alguns mediadores pelos mastócitos, tais como histamina, serotonina ou bradicinina (ROOME, *et al.*, 2008).

Pouco são os estudos relacionados à lectinas de algas que tenham apresentado algum efeito sobre o edema de pata induzido por dextrana. A lectina da alga vermelha *H. cervicornis*, administrada por via i.v., apesar de ter apresentado efeito antiedematogênico no edema induzido por carragenana, não apresentou o mesmo efeito quando o edema foi induzido por dextrana (BITENCOURY *et al.*, 2008). Em adição, a lectina da alga *S. filiformis* foi capaz de reduzir os edemas induzidos por dextrana e carragenana nas doses de 1,0; 3,0 ou 9,0 mg/kg (ABREU, 2012). Com relação a estudos de inflamação realizados com lectinas de plantas superiores, foi demonstrado que a lectina de sementes de *Araucaria angustifolia*, também administrada por via i.v., inibiu o edema de pata induzido por carragenana e dextrana (MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006).

Figura 15 – Efeito da Administração de LCc da Alga *C. cupressoides* no Modelo de Edema de Pata Induzido por Dextrana.



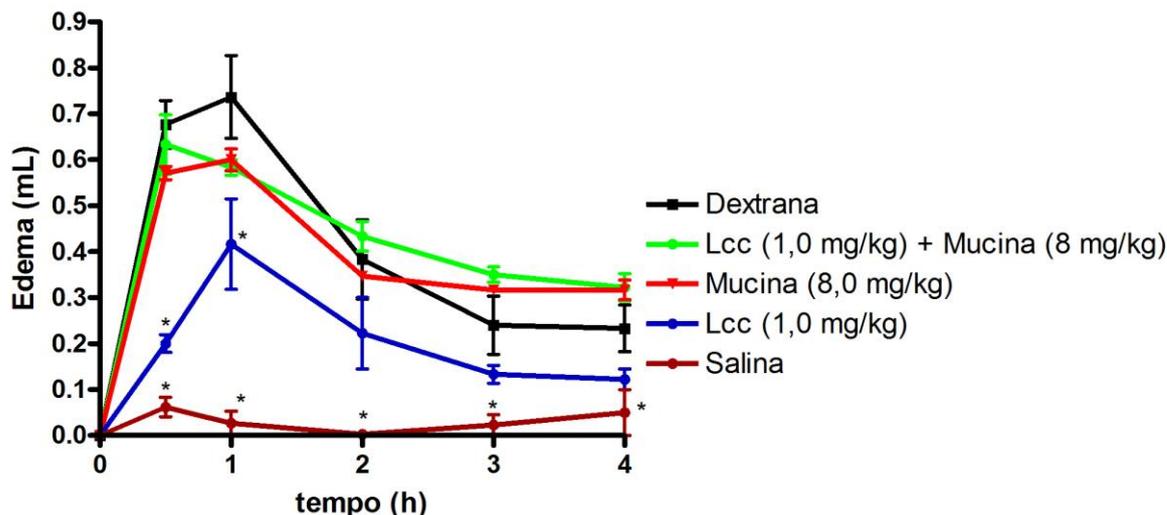
Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Dextrana (400 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. Antes do estímulo, os animais foram pré-tratados com solução salina estéril 0,9% (s.c.) ou LCc (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg; i.v.; 30 min). Os pontos sobre as linhas representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Dextrana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Quando associada ao seu açúcar ligante mucina (8,0 mg/kg), LCc (1 mg/kg) perdeu a capacidade de reduzir o edema induzido por dextrana, não diferindo significativamente do grupo dextrana (Figura 16).

Estes mesmo efeito também foi observado para a lectina da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis*, associada ao açúcar ligante a mucina (10,0 mg/kg) (BITENCOURT *et al.*, 2008) e para a lectina da alga vermelha *S. filiformis* associada ao açúcar ligante manana (ABREU, 2012).

Figura 16 – Efeito da Lectina Associada ao Seu Ligante Mucina Sobre o Edema de Pata Induzido por Dextrana.



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Dextrana (400 µg/pata; 100 µL) ou salina estéril (0,9%; 100 µL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. 30 min antes do estímulo, os animais foram pré-tratados com LCc (1,0 mg/kg; i.v.), LCc (1,0 mg/kg; i.v.) associada ao seu ligante mucina (8,0 mg/kg; i.v.) ou mucina (8,0 mg/kg; i.v.). Os pontos sobre as linhas representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Dextrana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

4.2.5 Edema de Pata Induzido por Histamina, Bradicinina ou Serotonina

Como a LCc mostrou-se capaz de reduzir o edema de pata induzido por dextrana, avaliamos o seu efeito na dose de 1,0 mg/kg nos ensaios de edema de pata induzidos pelos mediadores inflamatórios histamina (100 µg/pata, 100 µL), bradicinina (30 µg/pata, 100 µL) ou serotonina (20 µg/pata, 100 µL) por via s.c., com a finalidade de demonstrar se o efeito inibitório da inflamação ocasionado pela LCc está relacionado com esses mediadores.

O resultado obtido mostrou que somente o edema induzido por histamina apresentou uma inibição do edema de maneira significativa para o volume máximo de indução do edema (0,24±0,09mL, 30 min) sugerindo que a LCc atua como um antihistamínico (Tabela 1).

A histamina interage com os receptores inflamatórios H₁, H₂, H₃ e H₄, sendo que os receptores H₁ estão localizados, dentre outros locais, nos vasos sanguíneos. Os receptores H₂ localizam-se predominantemente na mucosa gástrica; enquanto que receptores H₃ são frequentemente expressos no SNC, e os receptores H₄ são encontrados em células hematopoiéticas periféricas como eosinófilos, neutrófilos e células TCD₄⁺ (MAINTZ; NOVAK, 2007; RABER, 2007). Fármacos como a loratadina, cimetidina e tioperamida agem especificamente nos receptores H₁, H₂ e H₃, respectivamente (SOUSA *et al.*, 2011; THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008). Foi observado que extratos de algas com o de *Enteromorpha linza*, *Chlorella vulgaris*, *Fucus vesiculosus* e *Spirulina platensis*, possuem a capacidade de impedir a liberação de histamina a partir dos mastócitos (PRICE; SANNY; SHEVLIN, 2002).

A serotonina é uma indolamida, produto da hidroxilação e carboxilação do aminoácido L-triptofano (LAZAROU; POMERANZ; COREY, 1998). É responsável por aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos (MAJNO; PALADE, 1961). É um potente agente inflamatório, quando comparada com a histamina em edema de pata de ratos (MALING, *et al.*, 1974). Ela é um mediador da resposta peristáltica intestinal e quando em excesso, a sua ação pode ser vista como uma resposta protetora para a infecção, o que facilita uma rápida remoção de organismo infectantes do intestino (SPILLER, 2007).

A bradicinina é um nonapeptídeo pró-inflamatório autacóide, também descrito como cinina plasmática, que atua localmente, produzindo dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e síntese de prostaglandinas (GILMAN *et al.*, 2006). Possui receptores do tipo B₁ e B₂. Os receptores B₁ são encontrados no músculo liso sendo supra-regulados pela presença do processo inflamatório e por citocinas. Já o receptor B₂ é um receptor com sete domínios transmembranais acoplado à proteína G (GILMAN *et al.*, 2006). A bradicinina tem sido estabelecida como um importante mediador periférico da dor atuando através da estimulação direta dos nociceptores (A δ e C fibras) e da liberação de substâncias inflamatórias e algogênicas, como os produtos derivados de vias de ácido araquidônico, citocinas e óxido nítrico (CALIXTO *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Edema de Pata Induzido por Histamina, Bradicininina ou Serotonina.

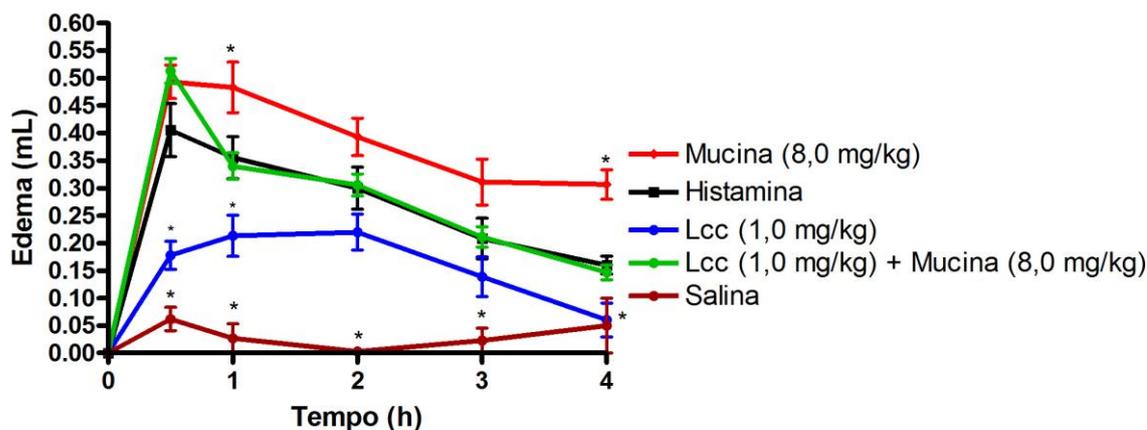
Grupos Experimentais	Edema de pata (mL)				
	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
Salina	0,06±0,05	0,03±0,06	0,00±0,01	0,02±0,05	0,06±0,09
Histamina	0,40±0,06	0,32±0,04	0,31±0,04	0,27±0,09	0,12±0,08
Histamina + LCc	0,24±0,09*	0,41±0,11	0,31±0,07	0,17±0,11	0,05±0,06
Bradicininina	0,63±0,18	0,55±0,09	0,44±0,03	0,37±0,05	0,31±0,05
Bradicininina + LCc	0,65±0,05	0,41±0,04	0,41±0,09	0,28±0,04	0,17±0,06
Serotonina	0,93±0,10	0,77±0,12	0,52±0,08	0,33±0,12	0,19±0,09
Serotonina + LCc	0,83±0,07	0,65±0,08	0,46±0,09	0,18±0,09	0,14±0,10

Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Histamina (100 µg/pata, 100 µL), bradicininina (30 µg/pata, 100 µL) ou serotonina (20 µg/pata, 100 µL) foram injetadas (s.c.) na pata posterior direita de ratos. Os animais foram pré-tratados com LCc (1,0 mg/kg; i.v.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%; 100 µL) 30 min antes de estímulos. Os valores (mL) representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle (apenas o mediador inflamatório). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

A LCc (1,0 mg/kg) quando associada ao seu açúcar ligante mucina (8,0 mg/kg), perdeu a capacidade de reduzir o edema induzido por histamina, não diferindo significativamente do grupo histamina, sugerindo que a ação anti-inflamatória da LCc está associada a inibição de eventos vasculares (Figura 17).

Figura 17 – Efeito da Lectina Associada ao Seu Ligante Mucina Sobre o Edema de Pata Induzido por Histamina.



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Histamina (100 µg / pata, 100 uL) foi injetada (i.pl.) na pata direita de ratos *Wistar*. 30 min antes do estímulo, os animais foram pré-tratados com LCc (1,0 mg/kg; i.v.), LCc (1,0 mg/kg; i.v.) associada ao seu ligante mucina (8,0 mg/kg; i.v.) ou mucina (8,0 mg/kg; i.v.). Os pontos sobre as linhas representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. * p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Dextrana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

4.2.6 Análise Histológica

Na análise histopatológica dos tecidos das patas, realizada através da coloração HE (Tabela 2), estão representados os escores (mediana; variação) atribuídos aos parâmetros de infiltrado celular e edema, comparando valores entre o grupo que recebeu Cg (700 µg/pata; 100 µL), como agente flogístico, e os tratados com a LCc (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg; i.v.). Um grupo controle recebeu apenas salina estéril no mesmo volume. A análise histológica dos tecidos mostrou diferença significativa (p<0,05) entre o grupo Cg.

Na 4ª hora após a indução da inflamação com o agente flogístico, foi verificado moderado processo inflamatório com infiltrado celular e formação de edema no grupo Cg. Entretanto, o grupo que recebeu salina apresentou processo inflamatório discreto. Os tipos celulares presentes no grupo Cg, após a indução da inflamação, são predominantemente polimorfonucleares (neutrófilos) caracterizando a inflamação aguda.

Tabela 2 – Análise Histológica do Tecido da Pata de Ratos Induzidos por Cg Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE).

	Infiltrado celular	Edema
LCc 0,1 mg/kg (i.v.)	3 (1-4)	2 (1-2)
LCc 1,0 mg/kg (i.v.)	3 (1-3)	2 (0-2)
LCc 10,0 mg/kg (i.v.)	2 (1-2) [#]	1 (0-2) [#]
Cg	3,5 (3-4)*	3 (2-3)*
Salina	1 (1-2)	1 (0-2)

Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

0 - ausência de infiltrado celular inflamatório, 1 - infiltrado celular inflamatório discreto, 2 - infiltrado celular inflamatório leve, 3 - infiltrado celular inflamatório moderado, 4 - infiltrado celular inflamatório intenso. Cg vesus salina *p<0,05, LCc vesus Cg [#]p<0,05 (ANOVA; Kruskal-Wallis e Dunn's).

Silva *et al* (2010b) observaram por análise histológica que após a indução da inflamação com Cg, utilizando o modelo de edema de pata, ocorre injúria tecidual com aumento significativo na migração de polimorfonucleares, seguido de formação de edema.

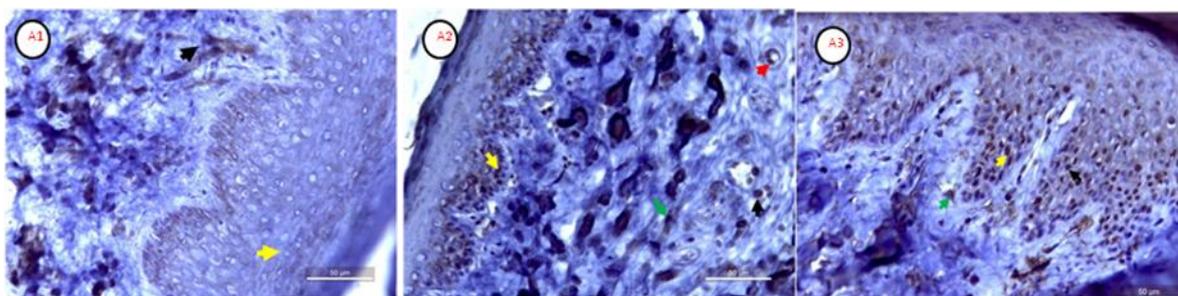
Foi observada redução do edema e do infiltrado celular inflamatório quando LCc (10,0 mg/kg) foi aplicada por via intravenosa (i.v.), confirmando os dados observados durante o período de 4 horas após a indução do processo inflamatório, na qual LCc apresenta efeito anti-inflamatório significativo na fase celular e vascular da inflamação.

4.2.7 Imunohistoquímica da LCc

Os tecidos das patas que foram tratados previamente com LCc (10,0 mg/kg; i.v.) foram retirados para ser realizado a análise por imunohistoquímica. Os mediadores

inflamatórios utilizados foram IL-1 β (Figura 18), HO-1 (Figura 19), TNF- α (Figura 20) e IL-6 (Figura 21). Um grupo controle recebeu por injeção (i.pl.) apenas salina estéril no mesmo volume.

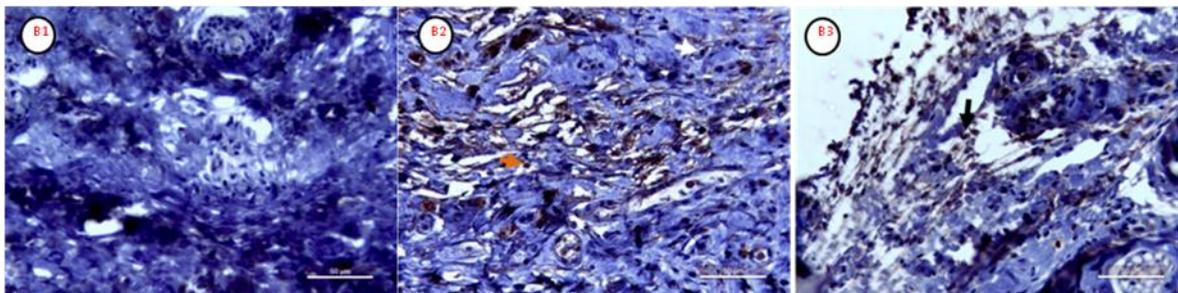
Figura – 18 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-1 β .



IL-1 β (A) [A1-Grupo salina (seta preta-neutrófilo, seta amarela-ceratinócito); A2- Grupo Cg (seta preta-neutrófilo, seta verde-fibroblasto, seta vermelha-célula endotélio, seta amarela-ceratinócito); A3-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.v. (seta preta-neutrófilo, seta verde fibrócito, seta amarela-ceratinócito)].

O estudo da expressão por imunohistoquímica para IL-1 β mostrou aumento de expressão de IL-1 β em neutrófilo, fibroblasto e célula endotelial nas patas de animais que receberam Cg (Figura 18 A2) em relação aos animais que receberam salina (Figura 18 A1), caracterizada pela coloração marrom nas células. A LCc 10,0 mg/kg; i.v. promoveu fraca marcação em fibrócito, neutrófilo e ceratinócito, evidenciando sua ação anti-inflamatória ao reduzir o mediador inflamatório IL-1 β .

Figura – 19 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para HO-1.

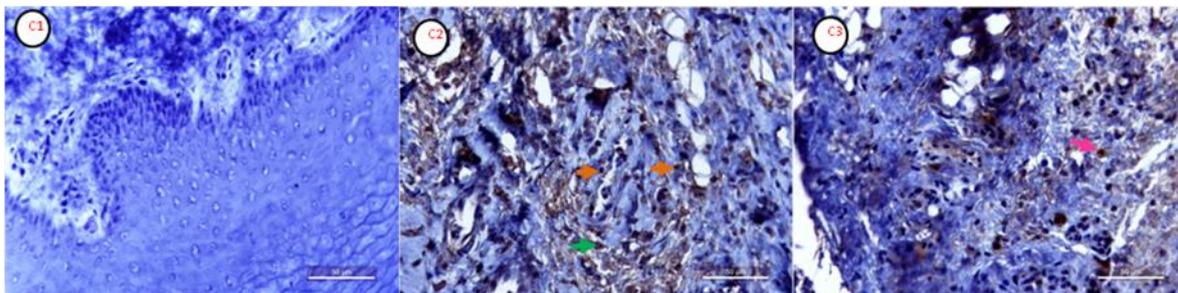


Hemo-oxigenase 1 (B) [B1-Grupo salina; B2- Grupo Cg (seta laranja-células mononucleares, seta branca-neutrófilo não marcado); B3-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.v. (seta preta-neutrófilo)].

O estudo da expressão por imunohistoquímica para HO-1 mostrou aumento de expressão de HO-1 em hemáceas e células mononucleares nas patas de animais que recebem Cg (Figura 19 B2) em relação aos animais que receberam salina (Figura 19 B1), este último não apresentando imunomarcação para HO-1. Foi observado intensa marcação celular para HO-1, identificada em neutrófilos nas patas de animais tratados com LCc 10,0 mg/kg; i.v. (Figura 19 B3) sugerindo que a LCc 10,0 mg/kg; i.v. atua reduzindo a inflamação pela ativação da via HO-1 devido à intensa marcação dos neutrófilos.

A HO é uma enzima microsossomal que catalisa a degradação do grupo heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM *et al.*, 1988). A ativação de HO-1, a forma induzida da HO, resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (ALCARAZ *et al.*, 2003). Vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO e BVD, são capazes de modular o processo inflamatório. HO-1 é geralmente expressa em condições de estresse oxidativo, isquemia e reperfusão e é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, NO, endotoxinas e heme, o seu substrato, representando um mecanismo de defesa celular que pode modular a resposta inflamatória (BAKKEN *et al.*, 1972; CAMHI *et al.*, 1995; DOI *et al.*, 1999; YACHIE *et al.*, 2003).

Figura – 20 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para TNF- α .



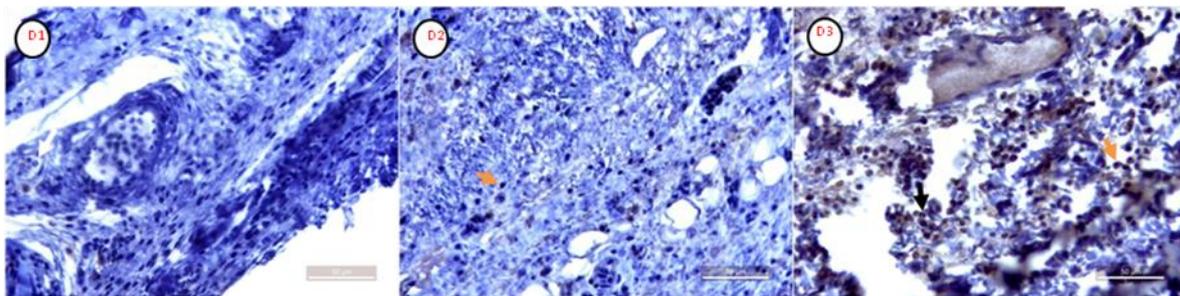
TNF- α (C) [C1-Grupo salina; C2- Grupo Cg (seta laranja-células mononucleares, seta verde-fibroblasto); C3- Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.v. (seta rosa-macrófago)]

O estudo da expressão por imunohistoquímica para TNF- α mostrou aumento de expressão de TNF- α no tecido da pata (Figura 20 C3), caracterizada pela marcação celular para células mononucleares e macrófagos, os grupos tratados com LCc não diferem do grupo Cg (Figura 20 C2), mostrando que não atuam pela via do TNF- α , sem que haja redução da inflamação.

O estudo da expressão por imunohistoquímica para TNF- α mostrou marcação intensa de TNF- α em células mononucleares nas patas de animais que recebem Cg (Figura 20 C2) e LCc 10,0 mg/kg; i.v. (Figura 20 C3), de forma semelhante entre os grupos. No grupo salina não houve imunomarcção para TNF- α . Esses resultados sugerem que a LCc 10,0 mg/kg; i.v. atua reduzindo a inflamação, porém sem inibição de TNF- α .

Sabe-se que TNF- α exerce funções de ativar linfócitos, de estimular a síntese de outras citocinas como IL-1 β e IL-6, de estimular a produção de PGs em sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile), o que estimula a síntese de colagenases e ativa osteoclastos (CUNHA *et al.*, 1992; ALSTERGREN *et al.*, 2000; ALSTERGREN, 1998; EMSHOFF *et al.*, 2000; KE *et al.*, 2007; OGURA *et al.*, 2005).

Figura – 21 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-6.



IL-6 (D) [D1-Grupo salina (seta branca- neutrófilo não marcado); D2- Grupo Cg (seta laranja-célula mononuclear); D3-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.v. (seta laranja-célula mononuclear , seta preta- neutrófilo)]

O estudo da expressão por imunohistoquímica para IL-6 mostrou aumento de imunomarcção em neutrófilos e células mononucleares no tecido da pata de animais tratados com LCc 10,0 mg/kg; i.v. (Figura 21 D3) comparado ao grupo Cg (Figura 21 D2). No grupo salina não houve imunomarcção para IL-6 (Figura 21 D1). Esses resultados sugerem que a LCc 10,0 mg/kg; i.v. atua reduzindo a inflamação, porém sem inibição de IL-6.

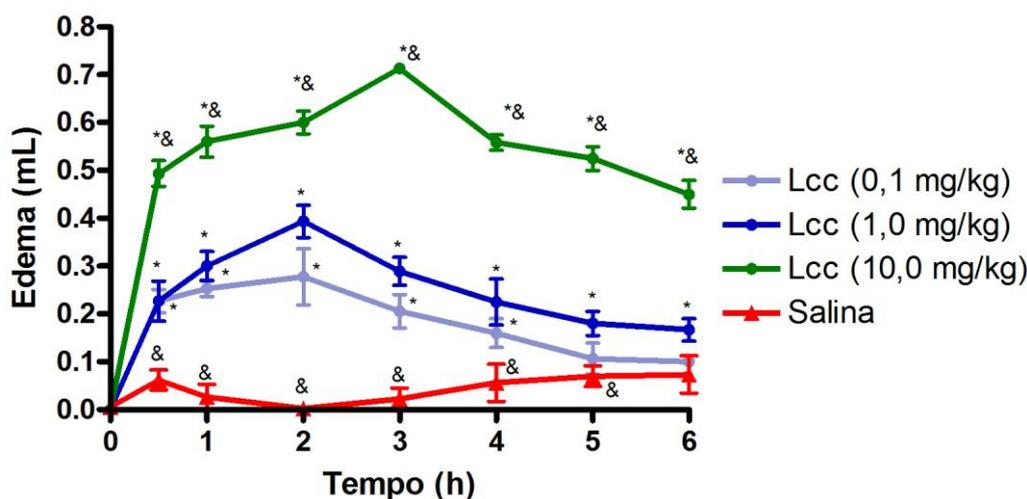
4.2.8 Avaliação do Efeito Edematogênico da LCc

Diante dos efeitos anti-inflamatórios obtidos para a LCc utilizando-se os modelos clássicos de edema de pata, a LCc também foi investigada quanto às suas propriedades edematogênicas.

4.2.8.1 Ensaio de Edema de Pata Induzido por LCc

A LCc foi injetada por via intraplantar (i.pl.;100 µL) nas doses de 0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg onde os resultados obtidos mostraram a formação de um edema significativo e intenso em todas as doses testadas, com o volume máximo de $0,71 \pm 0,02$ mL para a dose de 10 mg/kg na terceira hora, comparado ao grupo salina. (Figura 22).

Figura 22 – Efeito Edematogênico da Administração da LCc da Alga *C. cupressoides* no Modelo de Edema de Pata em Ratos.



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Os animais receberam injeção de salina (NaCl 0,9%) ou LCc (0,1; 1,0 ou 10,0 mg/kg; 100 uL/pata; i.pl.) na pata traseira de ratos. Os pontos sobre as linhas representam a média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença significativa quando comparado ao grupo salina; e $^{\&}$ $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LCc (1,0 mg/kg). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Tendo em vista que não há relatos de atividade edematogênica para lectinas purificadas de algas marinhas, vale ressaltar a existencia de estudos de atividade edematogênica para lectinas obtidas de sementes de plantas superiores. Assim, estudos de atividade edematogênica realizados por Alencar *et al.* (2004) demonstram que uma lectina isolada de sementes da leguminosa *Vatairea macrocarpa*, foi capaz de ocasionar edema de pata. Mota *et al.* (2006) utilizando uma lectina de sementes de *Araucaria angustifolia* (0,01, 0,1 ou 1,0 mg/kg) também apresentou efeito edematogênico local. O mesmo foi observado por Assreuy *et al.* (2009), utilizando as lectinas do gênero *Canavalia* (*Canavalia gladiata*, *C. brasiliensis* e *C. maritima*) que apresentaram efeito edematogênico para as diferentes doses utilizadas (0,01; 0,1 ou 1,0 mg/kg). Rangel *et al.* (2012) observaram que a lectina obtida de sementes de *Dioclea wilsonii* apresentou efeito edematogênico na dose de 1,0 mg/kg.

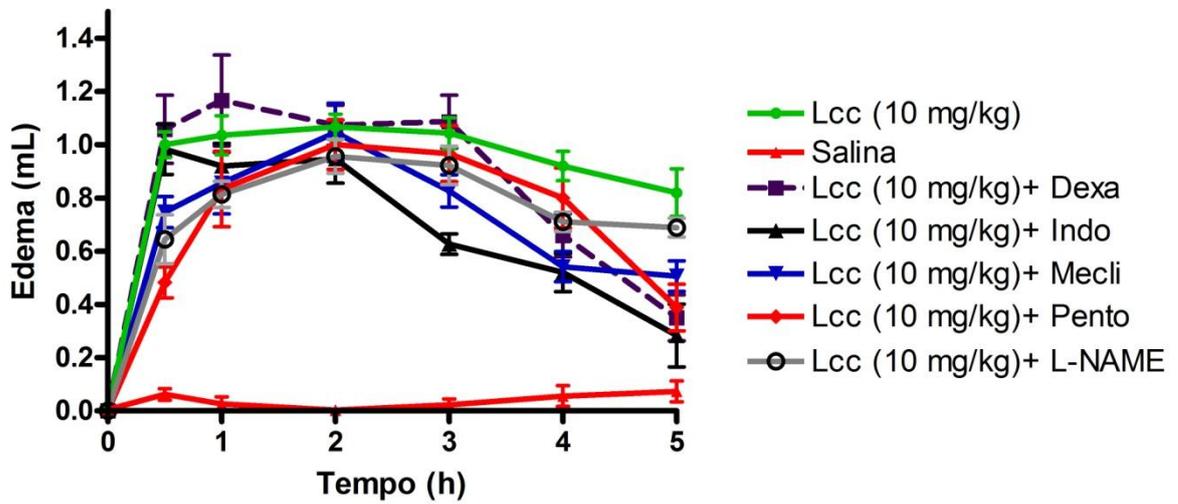
4.2.8.2 Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LCc

Devido ao intenso edema induzido pela LCc da alga *C. cupressoides* (10,0 mg/kg), foi investigada a modulação farmacológica das propriedades edematogênicas dessa lectina, realizando um pré-tratamento com os seguintes anti-inflamatórios: Indometacina (5,0 mg/kg; s.c.), Meclizina (40,0 mg/kg; s.c.), Pentoxifilina (90,0 mg/kg; s.c.), Dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.) e L-NAME (30 mg/kg; i.p.). Esses anti-inflamatórios foram selecionados por as seguintes características farmacológicas: Dexametasona é um glicocorticoide com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressora (ASSREUY *et al.*, 2008). Indometacina é um inibidor não específico da atividade da enzima ciclo-oxigenase e da síntese de prostaglandinas e tromboxanos além do metabolismo do AA (KANKURI *et al.*, 2001); L-NAME é um inibidor não específico das enzimas envolvidas na síntese e produção de óxido nítrico (NO) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991); Pentoxifilina é um inibidor da produção de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que participam de vários eventos da resposta inflamatória, incluindo a expressão de moléculas de adesão (CUNHA *et al.*, 2000), e meclizina é um inibidor de receptores de histamina (H₁) (ASSREUY *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos mostraram que o efeito edematogênico da LCc foi inibido em animais pré-tratados com Indometacina, na terceira, quarta e quinta hora com percentual de inibição de 39,94, 43,48 e 65,45%, respectivamente. Meclizina inibiu na quarta e quinta hora na ordem de 41,12 e 38,21%, respectivamente. Pentoxifilina e dexametasona inibiram na quinta hora na ordem de 52,27 e 57,32%, respectivamente. Por último, L-NAME inibiu apenas uma hora após o estímulo inflamatório com inibição de 21,50%, todos comparados ao grupo LCc (Figura 23). No entanto, estes resultados podem ser melhor observados através da Tabela 3.

Os inibidores também mostraram efeito antiedematogênico, sugerindo que a ação da LCc pode estar envolvida com citocinas primárias (TNF- α e IL-1 β), NO e receptores histamínicos, confirmados pelo edema induzido por histamina, o que mostra a complexidade do envolvimento da LCc no edema promovendo uma cascata de eventos pró-inflamatórios por diferentes compostos.

Figura 23 - Modulação Farmacológica da Atividade Edematogênica da LCc em Ratos.



Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Antes da aplicação do estímulo inflamatório (LCc 10,0 mg/kg; i.pl.), os ratos (n=6) foram pré tratados com indometacina (5,0 mg/kg; s.c.; 1 h); dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.; 1 h); L-NAME (30,0 mg/kg; i.p.; 30 min); pentoxifilina (90,0 mg/kg; s.c.; 1 h) ou meclizina (40,0 mg/kg; s.c.; 1 h). Grupos controles receberam o mesmo volume de LCc ou salina estéril. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis animais por grupo.

Tabela 3 – Modulação Farmacológica Após a Injeção Local da LCc da Alga *C. cupressoides* no Modelo de Edema de Pata.

Grupos Experimentais	Edema de pata (mL)					
	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
LCc (10,0 mg/kg)	1,00±0,09	1,04±0,13	1,07±0,09	1,04±0,11	0,92±0,09	0,82±0,16
Salina	0,06±0,03 ^{&}	0,03±0,04 ^{&}	0,01±0,00 ^{&}	0,02±0,04 ^{&}	0,06±0,07 ^{&}	0,07±0,05 ^{&}
Dexametasona + LCc	1,06±0,22	1,17±0,32	1,07±0,14	1,09±0,18	0,66±0,13	0,35±0,13 ^{&}
Indometacina + LCc	0,98±0,14	0,92±0,16	0,95±0,16	0,63±0,07 ^{&}	0,52±0,13 ^{&}	0,28±0,20 ^{&}
Meclizina + LCc	0,75±0,11	0,86±0,23	1,05±0,18	0,83±0,11	0,54±0,08 ^{&}	0,51±0,10 ^{&}
Pentoxifilina + LCc	0,48±0,10	0,83±0,24 ^{&}	1,00±0,17	0,97±0,19	0,80±0,21	0,39±0,19 ^{&}
L-NAME	0,64±0,18	0,81±0,07 ^{&}	0,96±0,10	0,92±0,14	0,71±0,07	0,69±0,07

Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

Antes do tratamento com LCc (10,0 mg/kg; 100 µL/pata; i.pl.), grupos de animais receberam indometacina (5,0 mg/kg; s.c.; 1 h); dexametasona (1,0 mg/kg; s.c.; 1 h); L-NAME (30,0 mg/kg; i.p.; 30 min); pentoxifilina (90,0 mg/kg; s.c.; 1 h) ou meclizina (40,0 mg/kg; s.c.; 1 h). Grupos controles receberam o mesmo volume de LCc ou salina estéril. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de seis animais por grupo. [&] p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado apenas com LCc (10,0 mg/kg). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

4.2.9 Análise Histológica

Na análise histológica dos tecidos das patas, realizada através da coloração HE (Tabela 4), estão representados os escores (mediana; variação) atribuídos aos parâmetros de infiltrado celular e edema, comparando valores entre o grupo que receberam LCc (0,1, 1,0 ou 10,0 mg/kg; 100 µL; i.pl.), como agente flogístico. Um grupo controle recebeu por injeção (i.pl.) apenas salina estéril no mesmo volume. A análise histológica dos tecidos mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina.

Foi observado que LCc (10,0 mg/kg; i.pl.) promoveu aumento de edema e do infiltrado celular inflamatório, similar ao observado no grupo que recebeu salina. No entanto, os tecidos das patas tratados com as doses 0,1 e 1,0 mg/kg apresentaram infiltrado inflamatório de leve a moderado, confirmando que o efeito das doses de LCc por via intraplantar, ocorre de forma dose-dependente.

Na literatura é relatado que lectinas podem apresentar efeito anti-inflamatório significativo quando administradas por via sistêmica, porém quando são injetadas localmente como agente indutor, utilizando o modelo de edema de pata, induzem processo inflamatório significativo (MOTA *et al.*, 2006).

Tabela 4 – Análise Histológica do Tecido da Pata de Ratos Induzidos por LCc Através da Coloração pelo Método Hematoxilina-eosina (HE).

	Infiltrado celular	Edema
LCc 0,1 mg/kg (i.pl.)	3 (3-4)	0 (0-0) [#]
LCc 1,0 mg/kg (i.pl.)	4 (3-4)	0,5 (0-1) [#]
LCc 10,0 mg/kg (i.pl.)	3,5 (1-4)	1,5 (0-3)
Salina	1 (1-2)	1 (0-2)

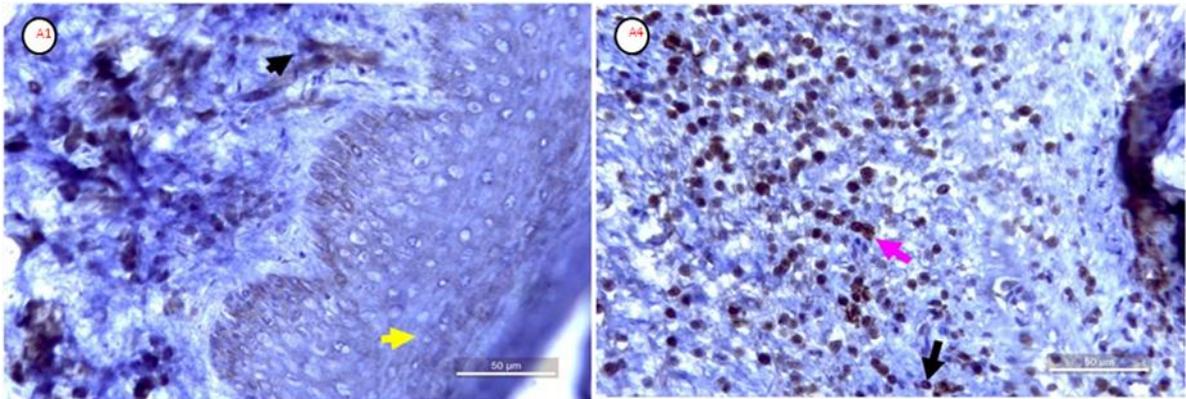
Fonte: Ismael N. L. de Queiroz

0 - ausência de infiltrado celular inflamatório, 1 - infiltrado celular inflamatório discreto, 2 - infiltrado celular inflamatório leve, 3 - infiltrado celular inflamatório moderado, 4 - infiltrado celular inflamatório intenso. LCc vesus salina [#]p<0,05 (ANOVA; Kruskal-Wallis e Dunn's).

4.2.10 Análise de Imunohistoquímica

Os tecidos das patas que foram tratados previamente com LCc (10,0 mg/kg; i.pl.) foram retirados para ser realizado a análise por imunohistoquímica. Os mediadores inflamatórios utilizados foram IL-1 β (Figura 24), HO-1 (Figura 25), TNF- α (Figura 26) e IL-6 (Figura 27). Um grupo controle recebeu por injeção (i.pl.) apenas salina estéril no mesmo volume.

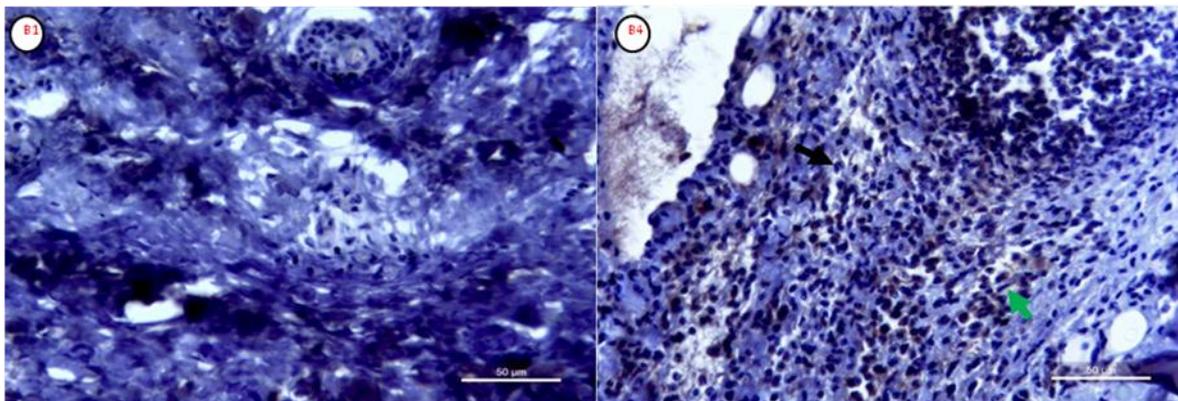
Figura – 24 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-1 β .



IL-1 β (A) [A1-Grupo salina (seta preta-neutrófilo, seta amarela-ceratinócito); A4-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.pl. (seta preta-neutrófilo, seta rosa-macrófago)].

O estudo da expressão por imunohistoquímica para IL-1 β mostrou que animais tratados com LCc 10,0 mg/kg; i.pl., observa-se que a marcação celular para IL-1 β foi identificada em neutrófilo e macrófago (Figura 24 A4), em maior intensidade que o grupo salina (Figura 24 A1), sugerindo que a lectina promove quadro inflamatório local via ativação de IL-1 β .

Figura – 25 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para HO-1.

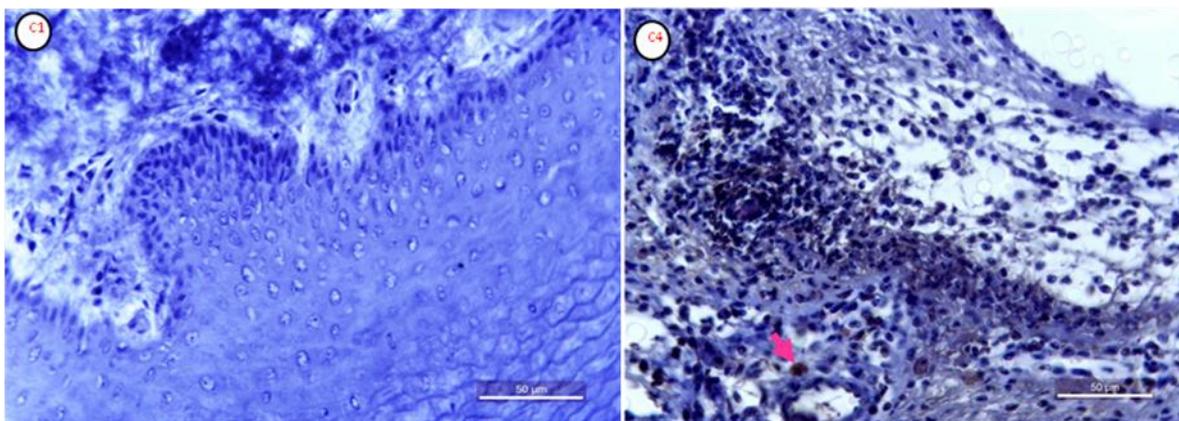


Heme oxigenase 1 (B) [B1-Grupo salina; B4-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.pl. (seta preta-neutrófilo, seta verde-fibroblasto)].

O estudo da expressão por imunohistoquímica para HO-1 mostrou aumento de expressão de HO-1 em neutrófilos nas patas de animais que recebem LCc (Figura 25 B4) em relação aos animais que receberam salina (Figura 25 B1), este último não apresentando imunomarcção para HO-1. LCc 10,0 mg/kg; i.pl., promove intensa marcação celular para HO-1 identificada em neutrófilos e fibroblastos (Figura 25 B4). Esses resultados sugerem que a LCc 10,0 mg/kg; i.v. atua na inflamação pela ativação da via HO-1 devido à intensa marcação dos neutrófilos.

A HO é uma enzima microsossomal que catalisa a degradação do heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro (ABRAHAM *et al.*, 1988). A ativação de HO-1, a forma induzida da HO, resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (ALCARAZ *et al.*, 2003). Vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO e BVD, são capazes de modular o processo inflamatório. HO-1 é geralmente expressa em condições de estresse oxidativo, isquemia e reperfusão e é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, NO, endotoxinas e heme, o seu substrato, representando um mecanismo de defesa celular que pode modular a resposta inflamatória (BAKKEN *et al.*, 1972; CAMHI *et al.*, 1995; DOI *et al.*, 1999; YACHIE *et al.*, 2003).

Figura – 26 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para TNF- α .



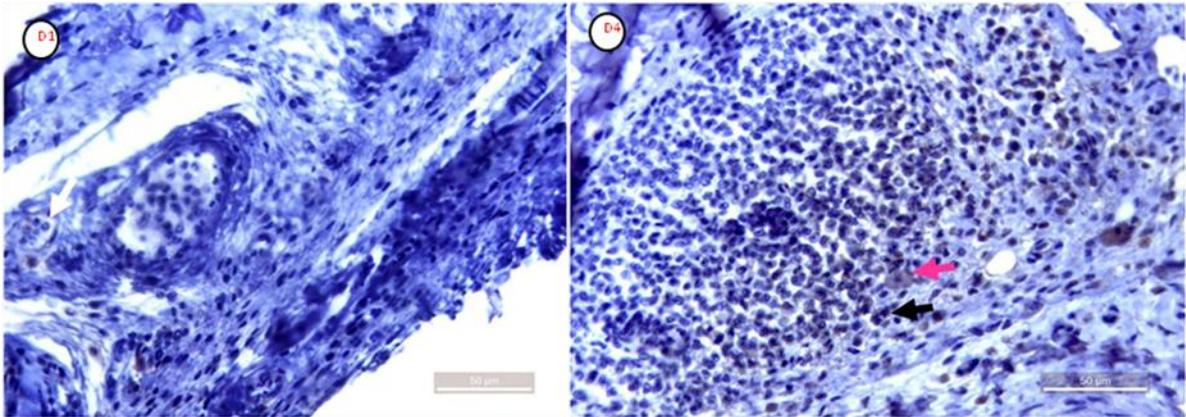
TNF- α (C) [C1-Grupo salina; C4-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.pl. (seta rosa-macrófago)]

O estudo da expressão por imunohistoquímica para TNF- α mostrou aumento de expressão de TNF- α no tecido da pata (Figura 26 C4), caracterizada pela marcação celular para macrófagos, os grupos tratados com LCc diferem do grupo salina (Figura 26 C4), mostrando que atua pela via do TNF- α , sem que haja redução da inflamação.

O estudo da expressão por imunohistoquímica para TNF- α mostrou marcação intensa de TNF- α em macrófagos nas patas de animais que recebem LCc 10,0 mg/kg; i.pl. (Figura 26 C4). No grupo salina não houve imunomarcação para TNF- α . Esses resultados sugerem que a LCc 10,0 mg/kg; i.pl. causa um quadro inflamatório sem ativar TNF- α em neutrófilos.

Sabe-se que TNF- α exerce funções de ativar linfócitos, de estimular a síntese de outras citocinas como IL-1 β e IL-6, de estimular a produção de PGs em sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile), o que estimula a síntese de colagenases e ativa osteoclastos (CUNHA *et al.*, 1992; ALSTERGREN, 2000; ALSTERGREN *et al.*, 2003; EMSHOFF *et al.*, 2000; OGURA *et al.*, 2005; KE *et al.*, 2007).

Figura – 27 Fotomicrografias, Obtidas por Microscopia de Luz Através da Coloração Pelo Método Hematoxilina-Eosina (HE), da Imunohistoquímica para IL-6.



IL-6 (D) [D1-Grupo salina (seta branca- neutrófilo não marcado); D4-Grupo LCc 10,0 mg/kg; i.pl. (seta preta-neutrófilo, seta rosa-macrófago)]

O estudo da expressão por imunohistoquímica para IL-6 mostrou aumento de imunomarcção em neutrófilos e células mononucleares no tecido da pata de animais tratados com LCc 10,0 mg/kg; i.pl. (Figura 27 D4) comparado ao grupo salina (Figura 27 D1). No grupo salina não houve imunomarcção para IL-6 (Figura 27 D1). Esses resultados sugerem que a LCc 10,0 mg/kg; i.pl. causa um quadro inflamatório ativando IL-6 em neutrófilos e macrófagos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc), obtida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, mostrou-se eficiente, obtendo-se um pico majoritário com atividade hemaglutinante.

A LCc por caracterização estrutural parcial apresentou na sua sequência NH₂-terminal com 31 resíduos de aminoácidos, apresentando 43% de identidade com a proteína da microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Através desta, sugere-se sua futura utilização como “etiqueta” para auxiliar na identificação de lectinas de algas marinhas verdes.

Na espectroscopia de ¹H-RMN para a LCc purificada por Sephadex G-100 e obtida por DEAE-celulose, foi demonstrado uma similaridade entre os sinais obtidos em ambos os espectros.

A LCc apresentou efeito anti-inflamatório (i.v.), reduzindo os edemas de pata induzidos por carragenana e dextrana. Possivelmente, seu mecanismo de ação pode estar relacionado à inibição de mediadores inflamatórios histamínicos, a redução da citocina inflamatória IL-1 β e ativação da via da HO-1.

Com relação ao efeito edematogênico da LCc (i.pl.), possivelmente atua pela ativação da via das ciclo-oxigenases e de citocinas primárias inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), além do envolvimento do NO.

O presente trabalho é o primeiro relato de sobre as atividades inflamatórias de lectinas de uma alga marinha verde em duas vias diferentes e seus mecanismos na ação não efeito anti-inflamatório.

CONCLUSÃO

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (LCc) obtida por cromatografia em DEAE-celulose, quando parcialmente caracterizada apresentou na sua sequência aminoterminal uma identidade de 43% com a proteína da alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, tendo mostrado um efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata, com mecanismo de ação possivelmente relacionado à inibição de mediadores inflamatórios histamínicos, a redução da citocina inflamatória IL-1 β e ativação da via da HO-1 e pró-inflamatória, com mecanismo de ação possivelmente relacionado com a ativação da via das ciclo-oxigenases e de citocinas primárias inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), além do envolvimento do NO.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, N. G. *et al.* Expression of heme oxygenase gene in rat and human liver, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 150, p. 717-722, 1988.

ABREU, T.M. **Efeitos da lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson na nocicepção e inflamação em animais.** 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ABREU *et al.* Cytokine Production Induced by Marine Algae Lectins in BALB/c Mice Splenocytes, **Protein & Peptide Letters**, n. 19, p. 975-981, 2012.

AINOUZ, I.L. *et al.* Agglutination of enzyme treated erithrocytes by brazilian marine algal extracts, **Botanica Marina**, v. 35, p. 475-479, 1992.

AINOUZ, I.L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, p. 15-19, 1995.

ALBERTINI, R. *et al.* Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 74, p. 101-107, 2004.

ALCARAZ, M.J. *et al.* Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway, **Current Pharmaceutical Design**, v.9, p. 2541-2551, 2003.

ALENCAR, N.M.N. *et al.* *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration, **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALSTERGREN, P. *et al.* Interleukin 1 β in synovial fluid from the arthritic temporomandibular joint and its relation to pain, mobility, and anterior open bite, **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, n. 9, p. 1059-1065, 1998.

ALSTERGREN P. Cytokines in temporomandibular joint arthritis, **Oral Diseases**, v. 6, p. 331-334, 2000.

ALSTERGREN, P. *et al.* Interleukin 1 β , Interleukin 1 receptor antagonist, and Interleukin 1 soluble receptor II in temporomandibular joint synovial fluid from patients with chronic polyarthritides, **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 10, p. 1171-1178, 2003.

ARAÚJO, I.W.F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation, **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207-1215, 2011.

ASSREUY, A.M.S. *et al.* Biological Effects of a Sulfated-Polysaccharide Isolated from the Marine Red Algae *Champia feldmannii*, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 31, p. 691-695, 2008.

ASSREUY, A.M.S. *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus, **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 509-521, 2009.

ASSREUY, A.M.S. *et al.* Edematogenic activity of a sulfated galactan from the red marine algae *Gelidium crinale*, **Pharmaceutical Biology**, n. 9, p. 1194-1198, 2012.

BAKKEN, A.F. *et al.* Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. HORMONAL CONTROL OF HEPATIC HEME OXYGENASE ACTIVITY, **The Journal of Clinical Investigation**, v. 51, p. 530-536, 1972.

BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor, **Scientific American Brasil**, v. 50, p. 76-83, 2006.

BENEVIDES, N.M.B.; LEITE, A.M.; FREITAS, A.L.P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n. 8, p. 117-122, 1996.

BENEVIDES, N.M.B. *et al.* Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Green Alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh, **Botanica Marina**, v. 44, p. 17-22, 2001.

BITENCOURT, F.S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*, **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 377, p. 139-148, 2008.

BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation, **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, p. 622-653, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation, **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BRICKS, L.F.; SILVA, C.A.A. Toxicidade dos antiinflamatórios não-hormonais, **Pediatrics**, v. 27, p. 181-193, 2005.

BRUM-JÚNIOR, L. **Metodologias para avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas**. 2006. Dissertação (Mestrado de Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

BRUNSWICK; JOHN S., What are Seaweeds and their Significance in Coastal Systems. **Seaweeds and Their Mariculture**, p. 317-326, 2009.

BONINA, F. *et al.* Note: 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin esters as new oral prodrugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 245-250, 1997.

BOYD, W.C.; ALMODOVAR, L.R.; BOYD, L.G. Agglutinins in Marine Algae for Human Erythrocytes, **Transfusion**, v. 6, p. 82-83, 1966.

CAMHI, S. L. *et al.* Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 13, p. 387-398, 1995.

CALIXTO, J.B. *et al.* Inflammatory pain: kinins and Antagonists, **Current Opinion in Anaesthesiology**, n. 14, p. 519-526, 2001.

CARDOZO *et al.* Metabolites from algae with economical impact, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CHÁVEZ, M.I. *et al.* On the importance of carbohydrate-aromatic interactions for the molecular recognition of oligosaccharides by proteins: NMR studies of the structure and binding affinity of AcAMP2-like peptides with non-natural naphthyl and fluoroaromatic residues, **Chemistry: A European Journal**, v. 11, p. 7050-7074, 2005.

COSTA, F.H.F. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*, **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 5, p. 53-61, 1999;

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis & Rheumatism**, v. 36, p. 147-157, 1993.

CUNHA, F.Q. *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia, **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, G.M.A. *et al.* Pentoxifylline improves learning and memory in glutamate-lesioned rats, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, p. 687-694, 2000.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist, **Int. Rev Immunolo**, v. 16, p. 457-499, 1998.

DINARELLO, C.A.; WOLFF, S.M. The role of interleukin-1 in disease, **N. Engl. Journal Med.**, v. 328, p. 106-113, 1993.

DI ROSA, M. Pharmacological properties of carrageenan, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, 89-102, 1972.

DOI, K. *et al.* Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth, **British Journal of Cancer**, v. 80, p. 1945-1954, 1999.

EMSHOFF, R. *et al.* Temporomandibular joint pain: Relationship to internal derangement type, osteoarthritis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor- α , **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 90, p. 442-449, 2000.

EL GAMAL, A.A. Biological importance of marine algae, **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 1-25, 2010.

FABIOLA, G.F. *et al.* Cyclooxygenase-2 – An attractive target for fruitful drug design, **Current Science**, v. 80, p. 26-34, 2001.

FERREIRA, S.H. Dor on line. Disponível em: < www.dol.com.br >. Acessado em Dezembro de 2011.

FIGUEIREDO, J.G. *et al.* Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide, **Toxicon**, v. 54, p. 736-744, 2009.

FIGUEIREDO, J.G. *et al.* Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96, p. 371-377, 2010.

FRANCO, G.C.N. *et al.* Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia, **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, p. 75-81 2006.

FREITAS *et al.* A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins, **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 495-501, 1997.

FREITAS *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation, **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 345-354, 2006.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour Progression, **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 521-534, 2006.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, **Science**, v. 294, p. 1871–1875, 2001.

FUNK, C.D.; FITZ GERALD, G.A. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk, **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, p. 470-479, 2007.

GILMAN, A.G. *et al.* **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GOODMAN, L. *et al.*, Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model, **J. Vet. Intern. Med.**, v. 23, p. 56-62, 2009.

GONZALEZ-PERIZ, A.; CLARIA, J. New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 297-309, 2007.

GRANGEIRO, N.M.G. *et al.* Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX-2 inhibitor, **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 112-119, 2011

GRAHAM, R.C. *et al.* PATHOGENESIS OF INFLAMMATION: II. In vivo observations of the inflammatory effects of activated Hageman Factor and bradykinin, **The Journal of Experimental Medicine**, v. 121, p. 807-818, 1964.

GREENWELL, H.C. *et al.* Biocombustível: microalgas podem ser a solução?, **Revista Panorama da Aqüicultura**, v. 28, p. 40-45, 2008.

GROSSER, T.; YU, Y.; FITZGERALD, G.A. Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 saga, **Annual Review of Medicine**, v. 61, p. 17-33, 2010.

HAMES, B.D. **Gel Electrophoresis of proteins: A practical Approach**. 3 ed. Oxford University Press, 1998.

HARNEDY, P.A.; FITZGERALD, R.J. Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae, **Journal of Phycology**, v. 47, p. 218-232, 2011.

HAZEWINKEL, H.A.W. *et al.* Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis modelo of arthritis in dogs, **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 74-79 2008.

HILÁRIO, M.O.E; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclo-oxigenase 2, **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 206-212, 2006.

HOLANDA, M.L.*et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1769-1773, 2005.

HORI, K.;MIKAZAWA, K.;ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae, **Hydrobiology**, v. 204-205, p. 561-566, 1990.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry, **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, p. 1349-1353, 1981.

ISHII, S; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 41-82, 2000.

IWALEWA, E.O. *et al.* Inflammation: the foundation of diseases and disorders, A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions, **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2868-2885, 2007.

JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae, **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.

JOLY, A.B. **Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**, 1965, 406 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1965.

KANKURI *et al.* Suppression of Acute Experimental Colitis by a Highly Selective Inducible Nitric-Oxide Synthase Inhibitor, *N*-[3-(Aminomethyl)benzyl]acetami, **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**,v. 298, p. 1128-1132, 2001.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KE, J. *et al.* Role of NF- κ B in TNF- α -induced COX-2 Expression in Synovial Fibroblasts from Human TMJ., **Journal of Dental Research**, v. 86, n.4. p. 363-367, 2007.

KULINSKY, V.I. Review: Biochemical aspects of inflammation, **Biochemistry**, v. 72, p. 595-607, 2007.

KOPP, S. The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1 β on temporomandibular joint pain and inflammation, **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 189-191, 1998.

KUMAR, V.; COTRAN, R.; ROBBINS, S. **Patologia Humana**. 7 ed. Elsevier: Espanha 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed. Elsevier 2005.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais, **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 5, p. 498-512, 2002.

LANDUCCI, E.C.T. *et al.* Inhibition of carrageenan – induced rat paw o edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2, **Brazilian of Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 578-583, 1995.

LAVROVSKY, Y. *et al.* Identification of binding sites for transcription factors NF- κ B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene, **Cell Biology**, v. 91, p. 5987-5991, 1994.

LAZAROU, J.; POMERANZ, B.H.; COREY, P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies **JAMA**, n. 279, p. 1200-1205, 1998.

LEE, P.J. *et al.* Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase-1 Gene in Response to Hypoxia, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 5375-5381, 1997.

LEE, J.L. *et al.* Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEES, P. *et al.* Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 479-490, 2004.

LEITE, Y.F.M.M. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effects on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1724, p. 137-145, 2005.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J. Marine Algae. A survey of research and utilization. **Botanical Marine Handbook**, 1969.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 678-689, 2007.

LIMA, M.E.P. *et al.* Purification of a Lectin from the Marine Red Alga *Gracilaria cornea* and Its Effects on the Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6414-6419, 2005.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition, **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LO, T.N. ; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 221, p. 261-267, 1982.

LÖWENBERG, M. *et al.* Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands, **Steroids**, v. 73, p. 1025-1029, 2008.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p. S232–S240, 2006.

MAITY, T.K. *et al.* Studies on anti-inflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam, Leguminosae), **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 221-223, 1998.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1185-1196, 2007.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cell, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology 2** ed. Oxford University Press 2004.

MAJNO, G.; PALADE, G.E. Studies On Inflammation I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular permeability: An Electron Microscopic Study, **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 11, p. 571-605, 1961.

MALIK, A.B.; LO, S.K. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation, **Pharmacological Reviews**, v. 48, p. 213-229, 1996.

MALING, H.M. *et al.* Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: Antagonists and mechanisms of action, **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 191, p. 300-310, 1974.

MASFERRER, J.L. *et al.* Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic, **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 91, p. 3228-3232, 1994.

McEVER, R. P. Leukocyte-endothelial cell interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, p. 840–849, 1992.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation, **Nature**, v. 454, p.428–435, 2008.

MEINI, S.; MAGGI, C.A. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin?, **Inflammation Research**, v. 57, p. 351-361, 2008.

MONCADA, S.; PALMER R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology, **Pharmacological Reviews**, v.43, p. 109-142, 1991.

MORRIS *et al.* Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and qualification, **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 35-46, 2003.

MOTA, M.R.L. *et al.* Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cell, **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 1-10, 2006.

NAGANO *et al.* HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family, **Protein Science**, v. 14, p. 2167-2176, 2005.

NARUMIYA, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice, **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, p. 1015-1022, 2009.

NASCIMENTO, A.E. **Efeitos tóxicos de lectina e toxina da alga marinha *Solieria filiformis* sobre camundongos e *Boophilus microplus* (carrapatos)**. 2003. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

NEVES, S.A. **Lectina de *Gracilaria caudata*: Isolamento e caracterização parcial e estudo comparativo do seu efeito indutor de migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, com o de outras lectinas de algas marinhas**. 1999, 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

NEVES, S.A. *et al.* Neutrophil migration induced *in vivo* e *in vitro* by marine algal lectins, **Inflammation Research**, v. 50, p. 486-490, 2001.

NEVES, S.A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamourox, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127-134, 2007.

OGURA, N. *et al.* Tumor necrosis factor- α increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint, **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, n. 6, p. 357-363, 2005.

OLIVIER, B.; VAN OORSCHOT, R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review, **European Journal of Pharmacology**, v. 526, p. 207-217, 2005.

OLIVEIRA, E.C.; ALVEAL, K.; ANDERSON, R. Mariculture of the Agar-Producing Gracilarioid Red Algae, **Reviews in Fisheries Science**, v. 8, p. 345-377, 2000.

OLIVEIRA, S.R.M. *et al.* Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capilacea* Santel & Hommers, **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 397-403, 2002.

OGAWA, S. *et al.* Histamine responses of large neostriatal interneurons in histamine H₁ and H₂ receptor knock-out mice, **Brain Research Bulletin**, v. 78, p. 189-194, 2009.

PAINE, A. *et al.* Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential, **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1895-1903, 2010.

PAPICH, M.G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals, **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, p. 1243-1266, 2008.

PÉREZ-SALA, D.; LAMAS, S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, p. 231-248, 2001.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins, **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.12, p.2569-2575, 2006.

POSADAS, I. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression, **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338, 2004.

POTAPOV, M.I. New anti-B lectins (phytohemagglutinins) including high-grade anti-B-1, **Izvestiia Akademii Nauk SSSR. Serii Biologicheskaja**, v. 5, p. 712-720, 1968.

PRICE III, J.A.; SANNY, C.; SHEVLIN, D. Inhibition of Mast Cells by Algae, **Journal of Medicinal Food**, v. 5, p. 205-210, 2002.

RABER, J. Visions & Reflections (Minireview): Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 735-741, 2007.

RAFFIN, R.P. *et al.* Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos, **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 2, p. 163-172, 2003.

RAJAKARIAR, R.; YAQOUB, M.M.; GILROY, D.W. COX-2 in inflammation and Resolution, **Molecular Interventions**, v.6 , p. 199-207, 2006.

RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**, 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANGEL, T.B.A. *et al.* Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl, **Biochimie**, v. 94, p. 525-532, 2012.

RIBEIRO R.A. *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice, **European Journal of Pharmacology**, n. 387, p. 111-118, 2000.

RODRIGUES, J.A.G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*, **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 282-292, 2012a.

RODRIGUES, J.A.G. *et al.* Comparative study of sulfated polysaccharides from *Caulerpa* spp. (Chlorophyceae). Biotechnological tool for species identification?, **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, p. 381-389, 2012b.

ROGERS, D.J.; BLUNDEN, B.;EVANS, P.R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin, **Medical Laboratory Sciences**, v. 34, p. 193-200, 1977.

ROGERS, D.J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments, **Hydrobiology**, v. 260-261, p. 589-593, 1993.

ROGERS, D.J. *et al.* Binding of N-acetyl-D-galactosamine by lectins from species of green marine alga genus, *Codium*. In: "Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Van Driessche, E.; Fisher, J.: **Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T.D.C.** 10 ed, p. 162-165, 1994.

ROOME, T. *et al.* *Aegiceras corniculatum* extract suppresses initial and late phases of inflammation in rat paw and attenuates the production of eicosanoids in rat neutrophils and human platelets, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 6-7, 2008.

ROTH, J. *et al.* Molecular aspects of fever and hyperthermia, **Immunol. Allergy Clin N. Am (Neurologic Clinics)**, v. 29. p. 229-245, 2009(v. 24, p. 421-439, 2006).

SAKATA, K. *et al.* The contractile action of leukotriene B₄ in the guinea-pig lung involves a vascular component, **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 449-456, 2004.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*, **Phytochemistry**, v. 48, p. 765-769, 1998.

SANDIG, H.; PEASE, J.E.; SABROE, I. Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD₂ and its metabolites in leukocyte function, **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 372-382, 2007.

SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SIQUEIRA, R.C.L. et al. *In vivo* anti-inflammatory effect of sulfated polysaccharide isolated from the marine algae *Lobophora variegata*, **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 167-174, 2011.

SILVA, D.K.; de ANDRADE, F.M. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptção de serotonina: uma revisão, **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul** [online], v. 30, p. 0-0, 2008, disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81082008000200004&lng=en&nrm=iso>, acessado em Novembro de 2012.

SILVA, F.R.F. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans, **Carbohydrate Polymers**, n. 79, p. 26-33 2010b.

SILVA, L.M.C.M. **Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin) Santelices & Hommersand**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008

SILVA, L.M.C.M. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 830-835, 2010a.

SOARES, M.P.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential, **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, p. 50-58, 2009;

SOUSA, A.A.S. et al. A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects, **Fundamental & Clinical Pharmacology**, DOI: 10.1111/j.1472-8206.2011.01001.x, 2011.

SPILLER, R. Serotonin, Inflammation, and IBS: Fitting the Jigsaw Together?, **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 45, p. S115-S119, 2007.

SPINOSA, Helenice de Souza; GORNIK, Silvana Lima; BERNARDI, Maeia Marth. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

STAFFORINI, D.M. *et al.* Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes, **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 40, p. 643-672, 2003.

STEAGALL, P.V. *et al.* Evaluation of the adverse effects of oral firocoxib in healthy dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p. 218-223, 2009.

STENGEL, D.B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application, **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483-501, 2011.

STEPHANO, J.L.; GOULD, M.; ROJAS-GALICIA, L. Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels, **Analytical Biochemistry**, v. 152, p. 308-313, 1986.

SZE, P. **A biology to the algae**, 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1997.

TARRANT, T.K.; PATEL, D.D. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis, **Pathophysiology**, v. 13, p. 1-14, 2006.

TATAKIS, D.N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review, **J. Periodontol.**, v. 64, p. 416-431, 1993.

TEIXEIRA, C. F. P. *et al.* Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v.42, p.947-62, 2003.

THURMOND, R.L; GELFAND, E.W; DUNFORD, P.J. The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 41-53, 2008.

TISCHNER, D.; REICHARDT, H.M. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, p. 62-70, 2007.

TRANDAFIR, C.C. *et al.* Cysteinyl leukotrienes and leukotriene B mediate vasoconstriction to arginine vasopressin in rat basilar artery, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 1027-1033, 2005.

TRI, P.H. Review of species of *Caulerpa* and *Caulerpella* (Chlorophyta, Bryopsidales) from Vietnam, **Marine Research in Indonesia**, v. 34, p. 33-45, 2009.

VAN DAMME, E.J.M. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structural and evolutionary related proteins with diverse biological roles, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VANDERLEI, E.S.O **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* em animais.** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

VANDERLEI, E.S.O. *et al.* A Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*, **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1113-1118, 2010.

VANDERLEI, E.S.O. *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*, **Inflammation Research**, v. 60, p. 1121-1130, 2011.

VIANA, G.S.B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz and *B. triquetrum* (S.G. Gmel) M. Howe, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 713-722, 2002.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica, **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VODOVOTZ, Y. *et al.* Translational systems biology of inflammation. *PLoS Computational Biology*, (advance online publication), 2008.

WANG *et al.* Structural Biology of Shared Cytokine Receptors, **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 29-60, 2009.

WATKINS, L. R. *et al.* Characterization of cytokine-induced hyperalgesia, **Brain Research**, v. 654, n. 1, p. 15-26, 1994.

WILLIS, D. *et al.* Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response, **Nature Medicine**, v. 2, p. 87-90, 1996.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, p.454-427, 2008.

Wendy Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2012. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 01 Nov. 2012.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G. W. Carrageenin induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WRIGHT, C.S. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II, **Journal of Molecular Biology**, v. 178, p. 91-104, 1984.

YACHIE, A. *et al.* Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children, **Experimental Biology and Medicine**, v. 228: 550-556, 2003.

YANG, G. *et al.* Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis, **Blood**, v. 97, p. 1306-1313, 2001.

YEDGAR, S. *et al.* Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword?, **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 28, p. 459-464, 2007.

ZANETTA, J.P. *et al.* Evidence for a lectin activity for human interleukin 3 and modeling of its carbohydrate recognition domain, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 38764-38771, 2002.

ZEMKE-WHITE, W.L.; OHNO, M. World seaweed utilization. An end-of-century summary, **Journal of Applied Phycology**, 1999.